



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

VEIKKO NURMIKKO: Biochemical Factors Affecting Symbiosis Among Bacteria 245

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

C. F. HUEBNER, M. E. KUEHNE, B. KORZUN, and E. SCHLITTLER: Rauwolfia Alkaloids XXVII. The Conversion of 3-Isoserpine to Reserpine	249
C. F. HUEBNER and D. F. DICKEL: Rauwolfia Alkaloids XXVI. Stereochemistry at C-17.	250
K. W. BENTLEY: The Biogenesis of the Morphine Alkaloids and Related Topics	251
K. MÜHLENTHALER und H. F. LINSKENS: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen	253
A. BRUNNER JR., A. VALLEJO-FREIRE, and P. SOUZA SANTOS: Electron Microscopy of Thin Sections of Reticulocytes	255
P. SENTEIN: Action de la triéthylènemélatine sur les mitoses de segmentation de l'oeuf de Pleurodèle.	257
J. HUBERTHA BIJTEL: The Growth of the Tail in Urodele Larvae	259
K. OEFF und A. KÖNIG: Lokale Kapillarpermeabilität und austauschbares Albumin in verschiedenen Organen der Ratte	260
M. TIŠLER: Tuberculostatic Activity of Some 4-Arylthiosemicarbazides and 4-Arylthiosemicarbazones	261
J. KNOLL: Über die Steuerung des Ionengleichgewichtes zwischen Zellen und umgebender Flüssigkeit beim isolierten Froschherzen	262
L. MAGOS: Hydrogen Peroxide and Heinz Bodies	264
G. GERZELI: Il tenore di acido desossiribonucleico negli eritrociti di <i>Anas Platyrhynchos</i> , <i>Cairina moschata</i> e dei loro ibridi diretti e reciproci	265
J. DAUSSET, Y. BERGEROT-BLONDEL, and A. PARAF: Relationship Between Passive Hemagglutination of Tanned Red Cells Coated with Fraction I and Fibrinolysis in Cirrhosis of the Liver	267
E. F. LÖSCHER: A Dialyzable Factor from Plasma Responsible for the "Viscous Metamorphosis" of the Blood Platelets. Its Role in Clot Retraction and Haemostasis	268
P. BÖHM and L. BAUMEISTER: Zum Vorkommen neuraminsäurehaltiger Glykoproteide	270
R. J. BOSCOFF, M. JEAVONS, and AMYA B. KAR: Preliminary on the Influence of Reserpine Therapy on Adrenocortical Function in Schizophrenia	271
F. ŠORM, A. JAKUBOVIČ, and L. ŠLECHTA: The Anticancerous Action of 6-Azaauracil (3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazine)	271
J. COMSA: Conséquences de la thymectomie sur la formule leucocytaire chez le cobaye	272
K. PALÁT, A. SEKERA and Č. VRBA: Eine neue Gruppe hochwirksamer Lokalanästhetika	273
CATHERINE POPOV: Contribution à l'étude d'une propriété répétitive du cerveau	274
S. DIJKGRAAF: Elektrophysiologische Untersuchungen an der Seitenlinie von <i>Xenopus laevis</i>	276
C. von EULER and U. SÖDERBERG: The Relation Between Gamma Motor Activity and the Electroencephalogram	278
P. Hník: Excitability Changes and Muscle Atrophy After De-afferentation	279
J. WEISS: On the Stability and the Reactions of the H_2O^+ Ion in Aqueous Solution	280
A. L. DELAUNOIS and T. O. KING: A New Fixative for Smoked Kymographic Tracings (Pro Experimentis)	281
E. DEL CONTE and M. STUX: Efficacy of some Histochemical Techniques for Acid Mucopolysaccharides (Pro Experimentis)	281
E. KELLENBERGER: Ultramikrotom mit mechanischem Vorschub. Vorrichtung zur Kontrolle der Schneide von geschärften Metallklingen (Pro Laboratorio)	282

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Congressus	284
Corrigendum	284

EXPERIENTIA



L'EXPERIENTIA publiera:

- 1° des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
- 2° de *brèves communications*;
- 3° informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées*.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienenener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.- pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.-. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.-, im Ausland sFr. 46.-.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 x 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $\frac{1}{1}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.-; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni*;
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports*;
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.- per la Svizzera; all'estero fr. 46.-. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 x 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $\frac{1}{1}$ pag. fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ pag. fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ pag. fr. 77.-; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.-; other countries fr. 46.-. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 x 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG. Basel

Verzeichnis der Inserenten - Liste des annonceurs - List of Advertisers - Experientia XII/7

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel

Ganz & Co., Zürich
Sandoz AG., Basel

Schwittiger AG., Basel
N. Zivy & Cie., S.A., Basel

Symposium über experimentelle Altersforschung

Symposium on experimental research on ageing

Basel, 4.-7. IV. 1956

Herausgeber/Editor:
Prof. Dr. F. Verzá, Basel

Inhalt:
Die am Symposium gehaltenen Referate

Contents:
Lectures held at the Symposium

Ca. 350 pp.
Ganzleinen Fr. DM 34.-

Autoren/Authors: L. Brull and C. Keil, Liège - R.E. Tunbridge, Leeds - D.A. Hall, Leeds - I. Bonga, J. Baló and D. Szabó, Budapest - F. Verzá, Basel - N.R. Joseph and F. Bourlière, Paris - J.F. Danielli, London - G.H. Bourne, London - L. Haranghy, P. Rács, E. Hársfalvy and F. Király, Budapest - F.H. Schulz, Leipzig - P.J. Thung, Amsterdam - F. Hügin and F. Verzá, Basel - V. Korenchevsky, London - R.B. Fisher, Oxford - O. Olbrich and E. Woodford-Williams, Sunderland - J.A. Huet, Paris - G. Di Macco, Torino - T. Geill, Kopenhagen - W.J.E. Jessop, Dublin - H. Baur, Basel - J. Nöcker, Leipzig - G. Schettler, Marburg - L. v. d. Horst, Amsterdam - J.A. Schneider, Berlin - W. Schulze, Ludwigshafen - V. Freyberg-Lucas and F. Verzá, Basel - J. Rechenberger, Leipzig - E. Greppi, G. Scardigli and G. Guidi, Firenze - M. Bürger, Leipzig - P. Divry, Liège - E.R.F.W. Crossman and J. Szafran, Birmingham - A.T. Welford, Cambridge - R. Brückner, O. Gsell, F. Hügin, E. Batschelet and F. Verzá, Basel - K. Fleischer, Leipzig - H. Ludwig, Basel - O. Mühlbock, Amsterdam - F.M. Antonio, Firenze.

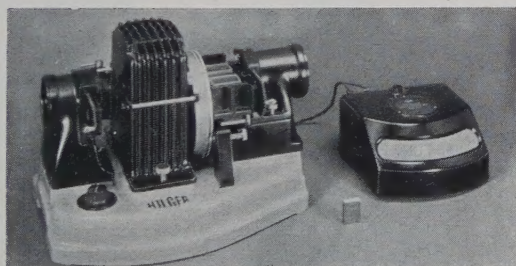
Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart



Bestellungen nimmt Ihr
Buchhändler entgegen

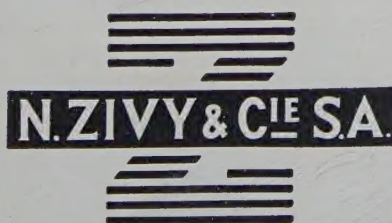
Orders
through your bookseller

HILGER Absorptiometer



auch für Sie!

Wer dieses Gerät ausprobiert hat, will kein anderes, denn es ist einfach im Aufbau, überall zugänglich, empfindlich und rasch. Mit wenigen Handgriffen in **Fluorimeter** oder **Nephelometer** umwandelbar. **Verlangen Sie Vorführung!**



Basel, Spalenring 164, Tel. (061) 22 97 86



LIEFERPROGRAMM

Hochvakuumgeräte · Vakuumpumpen · Kolorimeter · Spektrophotometer · Spektrographen
Spektralreine Substanzen
Heizgeräte für Labor · Hochdruckgeräte · Laborzentrifugen
Histologie-Präpariergeräte
Mikrotome und Ultramikrotome
Öl-Fett-Prüfgeräte

VERTRETUNGEN

Johnson, Matthey & Co. Ltd. London
Hilger & Watts Ltd. London
Jarrell Ash & Co. Newtonville U.S.A.
W. Edwards & Co. Ltd. London
Electrothermal Engineering Ltd. London
MSE Ltd. London
t'Hart & Zn. Rotterdam
Stanhope Eng. Co. Ltd. London

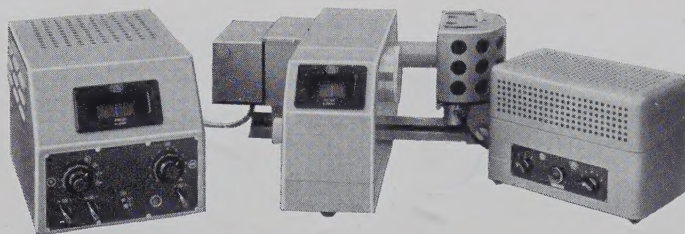
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05-657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal



Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

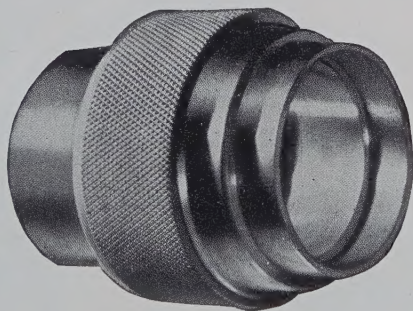
- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht - Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr). Meßbereich: 200 bis 1000 mμ, nachträgliche Erweiterung bis 2500 mμ möglich.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1 P28.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** in Vorbereitung, welche ohne Beschneidung des Spaltbildes verwendet werden können, d.h. kein zusätzlicher Lichtverlust.

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

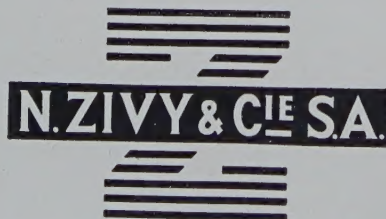
EDWARDS Vakuum-Schraubkupplung



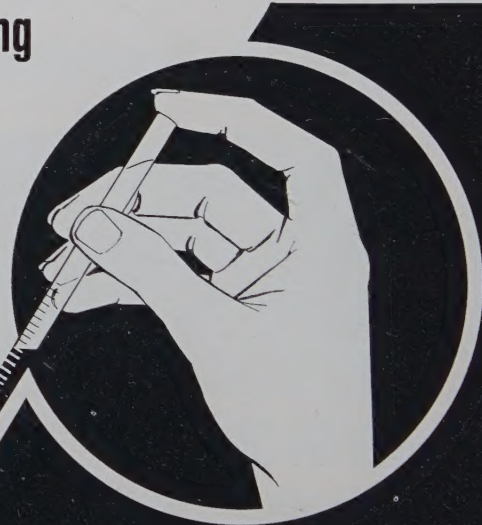
befreit Sie von den Sorgen über undichte Verbindungen an Ihrer Vakuumanlage!

Absolut dichte Vakuumsysteme mit allen Vorteilen lösbarer Verbindungen. Einigewenige Drehungen von Hand und das System schliesst bis mindestens 10^{-6} absolut vakuumdicht. Auch nach jahrelangem Gebrauch und vielfachem Öffnen und Schliessen keine deformierten oder beschädigten Dichtungsringe mehr.

Verlangen Sie unsere Unterlagen. Wir beraten Sie gerne über Einbau und Anwendung.



Basel 1, Spalenring 164, Tel. (061) 22 97 86



LIEFERPROGRAMM

Hochvakuumgeräte - Vakuum-
pumpen - Kolorimeter - Spektro-
photometer - Spektrographen
Spektralreine Substanzen
Heizgeräte für Labor - Hoch-
druckgeräte - Laborzentrifugen
Histologie-Präpariergeräte
Mikrotome und Ultramikro-
tome. Öl-Fett-Prüfgeräte

VERTRETUNGEN

Johnson, Matthey & Co. Ltd. London
Hilger & Watts Ltd. London
Jarrell Ash & Co. Newtonville U.S.A.
W. Edwards & Co. Ltd. London
Electrothermal Engineering Ltd. London
MSE Ltd. London
t'Hart & Zn. Rotterdam
Stanhope Eng. Co. Ltd. London

Biochemical Factors Affecting Symbiosis Among Bacteria

By VEIKKO NURMIKKO¹, Helsinki, Finland

The symbiotic interrelationships of micro-organisms among microbes or between microbes and higher organisms, are of fundamental importance in nature. Even a few classic examples are sufficient to indicate the great significance of the symbiosis phenomenon in biology and human ecology. Among the most important of these are symbiosis between root-nodule bacteria and leguminous plants, mycorrhiza formation between certain fungi and higher plants and lichen formation between algae and fungi. In addition, mention may be made of the cooperative associations of cellulose-decomposing fungi (or bacteria) and nitrogen-fixing bacteria in which, however, the relationships between the different organisms are not so strictly symbiotic as in the former cases.

Despite the fact that symbiotic and other associative relationships of microorganisms play an important role in nature and also in many fields of industrial microbiology, the functional mechanisms in symbiotic systems have, from a biochemical point of view, been comparatively little explored. (It may be stated that only symbiotic nitrogen fixation has been extensively studied by biochemists, e.g. by VIRTANEN and co-workers.) Consequently, our present knowledge of the metabolic pathways and chemical steps involved in the symbiotic interrelationships existing between different organisms is also, generally speaking, very meagre.

In particular, the lactic acid bacteria have a great ability to enter into associative relationships in mixed cultures. Their significance in the dairy industry is a well known example of their great importance. However, the associative, and especially symbiotic, relationships of lactic acid bacteria have been very little explored, and the biochemical nature of the associative growth is mostly not definitely known. On the other hand our knowledge concerning the nutritional requirements of these bacteria has increased extensively during the recent years (e.g. reviewed by SNELL² and RITTER³), and this affords new possibilities also for the study of the biochemistry of associative

relationships between lactic acid bacteria. The recent investigation has therefore been made with these bacteria with the special aim to obtain information concerning the biochemical factors underlying associative growth. The purpose of this article is to summarize the results of these experiments and it may conveniently be divided into the following sections: (1) Symbiosis between different species of lactic acid bacteria. (2) The symbiotic technique in the study of synthetic pathways of growth factors. (3) Conclusion.

Symbiosis between different species of lactic acid bacteria

During the course of investigation of factors influencing the associative growth of lactic acid bacteria it was found by the author in 1952 that close symbiotic interrelationships may exist between different species of these organisms⁴. When certain vitamin(s) and amino acid(s) essential for the growth of two strains were omitted from the otherwise complete synthetic medium (described by HENDERSON and SNELL⁵), both organisms were able to grow in symbiosis despite this lack, each producing the vitamins and amino acids needed by the other. On the basis of microbiological determinations made from the culture filtrates, it was concluded that the growth factors permitting symbiotic growth must be those vitamins and amino acids which are required for the growth of the separate symbionts. Figure 1 shows a typical example of these experiments. Two lactic acid bacteria *Streptococcus faecalis* R and *Lactobacillus arabinosus* 17-5 did not grow alone, but were able to grow together in a medium lacking folic acid (pteroyl-glutamic acid) and phenylalanine, although folic acid is required by *Str. faecalis* R and phenylalanine by *Lb. arabinosus* 17-5.

Symbiosis was likewise exhibited by the following pairs of lactic acid bacteria in synthetic media lacking other essential growth factors⁶. *Lb. arabinosus* 17-5

¹ Laboratory of Valio, Biochemical Institute, Helsinki, Finland.

² E. E. SNELL, in: *Bacterial Physiology*, edited by C. H. WERKMAN and P. W. WILSON (Acad. Press, New York 1951), p. 214. - E. E. SNELL, *Bacteriol. Rev.* 16, 227 (1952).

³ W. RITTER, VIth Intern. Congress for Microbiology, Roma, Symposium Nutrition and Growth Factors 1954, p. 157.

⁴ V. NURMIKKO, *Acta chem. Scand.* 6, 1258 (1952).

⁵ L. M. HENDERSON and E. E. SNELL, *J. biol. Chem.* 172, 15 (1948).

⁶ V. NURMIKKO, *Symbiosis Experiments Concerning the Production and Biosynthesis of Certain Amino Acids and Vitamins in Associations of Lactic Acid Bacteria*, *Ann. Acad. Sci. Fennicae* [AII] 54, 1-58 (1954).

(a phenylalanine-requiring strain) and *Str. faecalis* R (a folic acid-, threonine-, histidine-, and serine- or glycine-requiring strain) can grow in symbiosis when (a) phenylalanine, threonine and folic acid, or (b) phenylalanine and histidine, or (c) phenylalanine, serine and glycine were omitted from the synthetic medium. *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (a proline-, phenylalanine-, and glycine-requiring strain) and *Str. faecalis* R (a folic acid-requiring strain) were able to grow in symbiosis

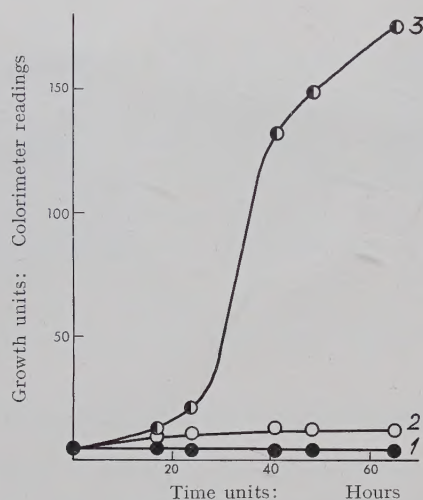


Fig. 1.—Growth of *Lactobacillus arabinosus* 17-5 and *Streptococcus faecalis* R in symbiosis. Synthetic basal medium without phenylalanine and folic acid (pteroylglutamic acid). Curve 1: *Str. faecalis* R (folic acid-requiring strain). Curve 2: *Lb. arabinosus* 17-5 (phenylalanine-requiring strain). Curve 3: *Lb. arabinosus* 17-5 and *Str. faecalis* R together.

in media lacking (a) proline and folic acid or (b) proline, phenylalanine, glycine, and folic acid. Further *Lb. fermenti*-36 (a phenylalanine-requiring strain) and *Str. faecalis* R (a folic acid-requiring strain) were able to grow in symbiosis in a medium lacking folic acid and phenylalanine, and likewise *Lb. leichmannii* (ATCC 4797) (vitamin B₁₂-requiring strain) and *Leuconostoc citrovorum* (ATCC 8081) (folic acid-requiring strain) in a medium (described by STEELE *et al.*⁷) from which vitamin B₁₂ and folic acid were omitted⁸. A similar symbiosis experiment as the lastmentioned was made recently also by DOCTOR and COUCH⁹.

On the basis of these symbiosis experiments it was concluded that the following growth factors (or in certain cases probably compounds possessing their activity) were excreted into the growth medium by the lactic acid bacteria used: phenylalanine, proline, threonine, histidine, glycine, serine, folic acid, folinic acid, and vitamin B₁₂. The amounts of some amino

acids and vitamins were also determined using the microbiological assay method.

Similar interrelationships were observed in experiments in which different species of lactic acid bacteria were separated from each other by a dialyzing membrane¹⁰. Using a dialysis cell with several compartments especially designed for these experiments it was found that different species can grow not only in pairs in symbiosis, but also in associations of more than two different species. Figure 2 shows a symbiosis experiment made with six species of lactic acid bacteria. Among these bacteria only *Str. lactis* (ATCC 7963) was able to grow alone in a medium (described by ANDERSON and ELLIKER¹¹) lacking folic acid, folinic acid, and phenylalanine. Of these growth factors folic acid was required by *Str. faecalis* R, folinic acid by *Ln. citrovorum* (ATCC 8081), and phenylalanine by *Lb. arabinosus* 17-5, *Lb. fermenti*-36, and *Ln. mesenteroides* P-60. Although these essential growth factors were omitted from the medium all six strains were able to grow despite this lack when inoculated into separate compartments of the dialysis cell. The growth in the compartments was found to be due to the ability of the different species to synthesize and excrete into the medium vitamins and amino acids required by the strain of the adjoining compartment. The growth factors produced in each compartment then passed

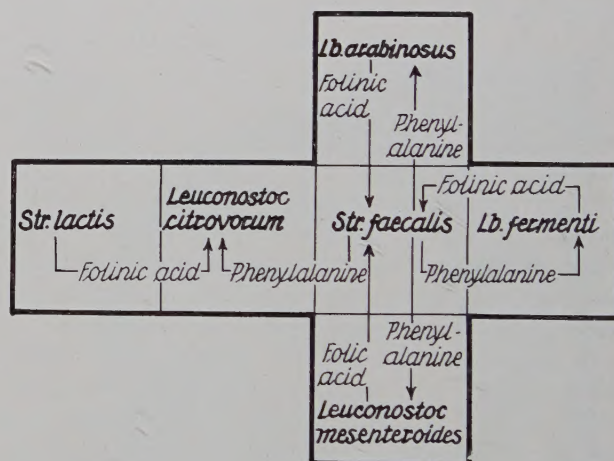


Fig. 2.—Symbiosis between six different species of lactic acid bacteria in a dialysis cell with six compartments.

across the dialyzing membrane to each adjoining compartment, permitting symbiotic growth in the dialysis cell.

The symbiotic technique in the study of synthetic pathways of growth factors

The symbiotic technique is based on the fact that different species and strains of lactic acid bacteria are

⁷ B. F. STEELE, H. E. SAUBERLICH, M. S. REYNOLDS, and C. A. BAUMAN, *J. biol. Chem.* **177**, 533 (1949).

⁸ V. NURMIKKO, VIth Intern. Congress for Microbiology, Roma, Symposium Nutrition and Growth Factors 1953, p. 97.

⁹ V. M. DOCTOR and J. R. COUCH, *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 530 (1954).

¹⁰ V. NURMIKKO, *Acta chem. Scand.* **9**, 1317 (1955).

¹¹ A. W. ANDERSON and P. R. ELLIKER, *J. Dairy Sci.* **36**, 161 (1953).

able to carry out defined steps in the biosynthesis of certain growth factors and that during growth they are also capable of excreting growth factors into the medium. By cultivating together two strains, each capable of carrying out only a limited part of the biosynthesis of a certain growth factor, it is possible to form a symbiotic system which may afford possibilities of investigating in detail the synthetic pathway of the growth factor concerned. The principles of this method may be illustrated by means of the following scheme:

Symbiotic system formed by two lactic acid bacteria

Or-ganism	Enzyme systems catalyzing the following re-action sequences are present	Enzyme systems catalyzing the following re-action sequences are absent	Requires as essential growth factor	Growth factor excreted into the medium
1	$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow P$	$C \rightarrow D \rightarrow E$	E	C
2	$C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow P$	$A \rightarrow B \rightarrow C$	C	E

The symbiotic system shown above is formed by two organisms each able to carry out only a limited reaction sequence in the biosynthesis of a growth factor E . It depends on the deficient synthetic abilities of the two

organisms that the growth factor E is required by one of these organisms (organism 1) and an intermediate product C by the other (organism 2). In addition to forming an intermediate stage in the synthesis of E , compound C also functions as a precursor in the synthesis of another compound, P .

When both essential growth factors C and E are omitted from the nutrient solution neither of the organisms is able to grow in this incomplete medium alone. However, when inoculated together, they can grow well. The symbiotic growth is due to the fact that organism 1 synthesizes and excretes into the medium the growth factor C required by organism 2, which then synthesizes the compound E , an essential growth factor for organism 1.

If, for instance, one wants to investigate possible intermediates existing in the reaction sequence $C \rightarrow D \rightarrow E$, not only compounds C and E but also compound D , which is supposed in this example to be the only known intermediate in this reaction sequence, are omitted from the nutrient solution. If the reaction(s) catalyzed by the growth factor E is (are) known, the endproduct(s) of this reaction can perhaps also be excluded from the medium, in order that the requirement of organism 1 for the growth factor E may increase. The exclusion of the intermediate D and the endproduct(s) of the reaction(s) catalyzed by the

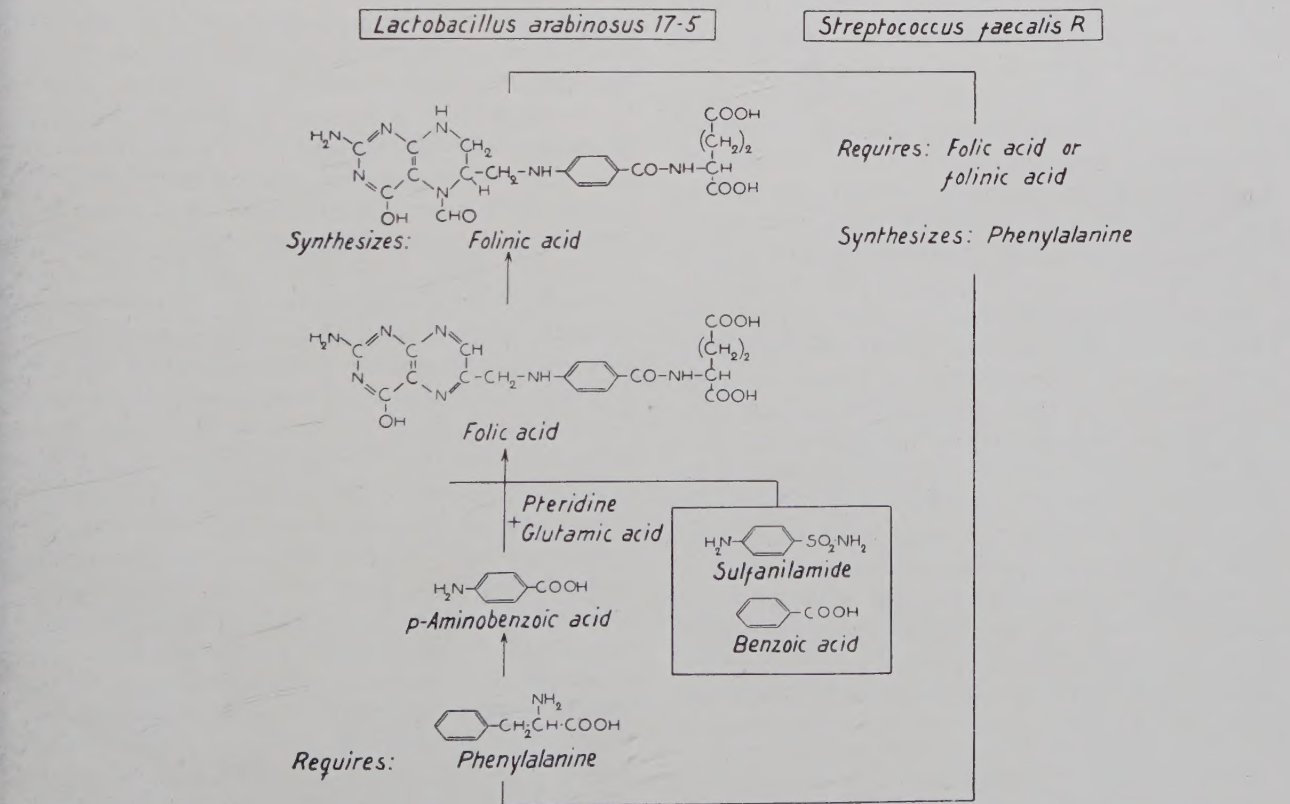
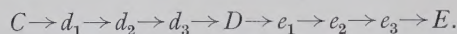


Fig. 3.—Scheme showing relationships between *p*-aminobenzoic acid, folic acid, folinic acid, phenylalanine, sulfanilamide, and benzoic acid during the symbiotic growth of *Lactobacillus arabinosus* 17—5 and *Streptococcus faecalis* R.

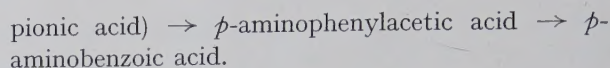
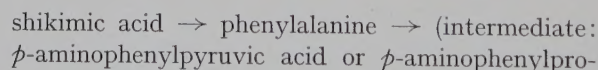
growth factor *E* may result in a distinct retardation in the symbiotic growth. By investigating which of the compounds related to *C*, *D*, and *E* have the ability to restore the initial vigorous symbiotic growth it is possible to conclude which compounds may function as intermediates in the reaction sequence $C \rightarrow D \rightarrow E$. If those compounds which are able to replace *D* and *E* are denoted as d_1, d_2, d_3 , and e_1, e_2, e_3 one gets the following reaction sequence as the synthetic pathway for the growth factor *E* from the precursor *C*:



It should be especially noted that the essential growth factor *C* is a precursor for *two* different biosyntheses. It is this fact which makes it very difficult, and in some cases even impossible, to investigate the reaction $C \rightarrow E$ by using organism 1 alone. One should then *at the same time* have to examine which compounds belong to the reaction stages $C \rightarrow D$ and $C \rightarrow P$. If the compound *C*, for instance, is an amino acid required by organism 1 for its protein synthesis (*P*), the finding of suitable intermediate compounds for the reaction $C \rightarrow P$ presents extreme difficulties at the moment.

Using a symbiotic system formed by the species *Lb. arabinosus* 17-5 and *Str. faecalis* R, the author has made an investigation into the biosynthesis of *p*-aminobenzoic acid¹². It was found that the metabolic reaction sequences of these strains with respect to the growth factors phenylalanine, *p*-aminobenzoic acid, folic acid, and folinic acid were coupled together in the way shown in Figure 3. As appears from the scheme, *Str. faecalis* R was able to carry out only the first part of the biosynthesis of folinic acid, up to phenylalanine, and *Lb. arabinosus* 17-5 only the latter part of this synthesis, i.e., the reaction phase phenylalanine $\rightarrow$ folinic acid.

To investigate with this symbiotic system the mechanism involved in the biosynthesis of *p*-aminobenzoic acid, the growth factors phenylalanine, *p*-aminobenzoic acid, folic acid, and folinic acid were omitted from the medium, a distinct retardation in the symbiotic growth resulting. By testing which of the compounds related to *p*-aminobenzoic acid and phenylalanine were able to restore the initial symbiotic growth, it was possible to discover some compounds which may constitute intermediates in the synthetic pathway of this vitamin. On the basis of the observations made it seems reasonable to postulate the following mechanism for the biosynthesis of *p*-aminobenzoic acid:



Moreover, the finding that phenylalanine has a powerful influence upon the production of folinic acid by *Str. lactis* (ATCC 7963) confirms the assumption that in lactic acid bacteria this amino acid functions as a precursor of *p*-aminobenzoic acid¹³, a vitamin which is in itself an intermediate compound in the synthesis of folinic acid.

Conclusion

In the light of the experimental findings obtained in this investigation, it seems very probable that symbiosis among micro-organisms affords, from the biochemical point of view, a new and interesting object for research with possibilities of elucidating various metabolic processes in the living cell. Summarizing, it may be stated that this investigation showed that the different species of lactic bacteria growing in associations were capable of forming close symbiotic interrelationships in nutritionally deficient media. It was also found that the symbiosis phenomenon can be applied to the study of the mechanism of the biosynthesis of growth factors. Using this method, called the symbiotic technique, evidence has been obtained indicating that the amino acid phenylalanine may function as a precursor in the biosynthesis of the vitamin *p*-aminobenzoic acid. It should especially be noticed that in the experimental example given, the phenylalanine required by *Lb. arabinosus* 17-5 is an essential precursor for two different syntheses, namely for that mentioned above, and in addition for protein synthesis. This being the case, the investigation of the mechanism of conversion of phenylalanine to *p*-aminobenzoic acid using *Lb. arabinosus* 17-5 alone as a growing system would present great experimental difficulties. Also the fact, discovered in symbiosis experiments, that *p*-aminobenzoic acid is an essential vitamin for the growth of *Lb. arabinosus* 17-5, but only in the absence of phenylalanine, seems very difficult to establish using this organism alone. As these observations indicate, it is possible by means of the symbiotic technique to discover new growth factor requirements in bacteria, and also to investigate the biosynthetic pathways of growth factors where, perhaps, investigations using the classical pure culture methods would have given no result.

Finally, it ought to be emphasized that our knowledge of the living processes in the microbial cell is based almost entirely on the pure culture studies. However, pure cultures of a single micro-organism seldom exist in nature. On the contrary, microbes live in soils, water, alimentary tract of human beings and animals etc., in mixed populations with complex interrelationships. Consequently, in the pure culture the

¹² V. NURMIKKO, Acta chem. Scand. 7, 942 (1953); Ann. Acad. Sci. Fennicae [AII] 54, 1-58 (1954).

¹³ V. NURMIKKO, Suomen Kemistilehti [B] 28, 62 (1955).

metabolic functions of a certain microorganism may not be a true representation of its chemical activity in nature. Particularly therefore there is a need of investigating the biochemical mechanisms whereby the metabolic processes of associative organisms are coupled together. On the basis of the findings described in this paper it may be concluded that the symbiotic technique as opposed to the classical pure culture method is useful in the study of the biochemistry of microbial associations existing in different natural conditions.

Acknowledgements. I wish to express my gratitude to Professor ARTTURI I. VIRTANEN, Director of the Biochemical Institute, for valuable discussions and criticism. I also wish to thank Professor E. E. SNELL, University of Texas, for the strains of lactic acid bacteria, Dr. H. P. BROQUIST, American Cyanamid Company, New York, for the sample of leucovorin, and Dr. B. D. DAVIS, Cornell University Medical College, for the sample of shikimic acid.

Zusammenfassung

Die zusammenwirkenden, insbesondere symbiontischen Faktoren, die in einer Bakterienmischkultur zur Wirkung kommen, sind noch wenig bekannt. Der vorliegende Übersichtsartikel orientiert über die gegenseitige Förderung verschiedener Milchsäurebakterien in synthetischen Nährlösungen mit besonderer Berücksichtigung einiger biochemischer Faktoren. Bei allen Versuchen wurden bestimmte, für das Wachstum unentbehrliche Vitamine oder Aminosäuren aus den Nährlösungen weggelassen. Es ergab sich, dass verschiedene

Milchsäurebakterienstämme in einer Nährlösung miteinander gedeihen können, in welcher der eine oder der andere Stamm für sich allein mangels lebenswichtiger Vitamine oder Aminosäuren nicht hätte gedeihen können. Einige Milchsäurebakterien sind somit zur Synthese der von anderen Organismen benötigten Vitamine und Aminosäuren befähigt. Beispiele: *Lactobacillus arabinosus* 17-5 bildet die für *Streptococcus faecalis* R notwendige Folsäure (oder Folinsäure) und umgekehrt *Str. faecalis* R das für *Lb. arabinosus* 17-5 unentbehrliche Phenylalanin (Abb. 1).

Auf Grund dieser symbiontischen Beziehungen zwischen verschiedenen Milchsäurebakterienstämmen wurde eine Methode, die sogenannte Symbiose-Technik, für die Untersuchungen der Biosynthese der verschiedenen Wachstumsfaktoren entwickelt. Die theoretische Grundlage dieser Methode ist vom Verfasser ausgearbeitet worden. Mit Hilfe dieser Methode wurden Untersuchungen über die Biosynthese von *p*-Aminobenzoesäure ausgeführt. Die Versuche zeigen, dass die Aminosäure Phenylalanin bei Milchsäurebakterien als Vitamin-Vorstufe auftritt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die erwähnten zusammenwirkenden symbiontischen Wachstumsfaktoren (Aminosäuren und Vitamine) bei der Entwicklung von Bakterienmischkulturen in der Natur eine wichtige Rolle spielen. Der Verfasser hebt besonders hervor, dass das Studium der Symbiose in der Natur mit Hilfe dieser neuesten Methode sehr interessant wäre. Es lässt sich denken, dass zum Beispiel bei diesem Vorgehen neue biochemische Prozesse und Wachstumsfaktoren gefunden werden, die mit Hilfe der klassischen Reinkulturmethode nur schwierig festzustellen wären.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Rauwolfia Alkaloids XXVII

The Conversion of 3-Isoreserpine to Reserpine

The synthesis of *d,l*-3-isoreserpine recently reported by WOODWARD¹ gives added import to the conversion of 3-isoreserpine to reserpine for which we wish to record two methods. The epimerization of reserpine and its derivatives at C-3 was previously stated to proceed to completion under the reaction conditions employed as far as could be measured². This conclusion was based on the failure to isolate unepimerized reserpine from the reaction mixture. Mindful of the limitations of this

means of assaying the completeness of the reaction, we applied the more precise method of paper chromatographic analysis to the problem. In the system benzene-cyclohexane (1:1) as the mobile phase on formamide-methanol (7:3) impregnated Whatman No. 1 paper, reserpine and 3-isoreserpine had *R_f* values of 0.32 and 0.82 respectively. This is a slight modification of the system already described for the paper chromatography of *Rauwolfia* alkaloids³.

A study of the isomerization of reserpine in various new media led to the observation that in refluxing acetic acid a considerable amount of reserpine remains unepimerized. 3-Isoreserpine, prepared as already described⁴

¹ R. B. WOODWARD, Nichols Award Address, March 16, 1956. New York, N. Y.

² H. B. MACPHILLAMY, L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, J. Amer. chem. Soc. 77, 1071 (1955). - H. B. MACPHILLAMY, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, A. F. ST. ANDRÉ, and P. R. ULSHAFFER, J. Amer. chem. Soc. 77, 4335 (1955).

³ F. A. HOCHSTEIN, K. MURAI, and W. H. BOEGEMANN, J. Amer. chem. Soc. 77, 3551 (1955). - A. F. ST. ANDRÉ, B. KORZUN, and F. WEINFELD, J. org. Chem. 21, in press (1956).

⁴ H. B. MACPHILLAMY, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, A. F. ST. ANDRÉ, and P. R. ULSHAFFER, J. Amer. chem. Soc. 77, 4335 (1955).

by epimerization of reserpine in refluxing acetic anhydride, contained less than 0.01% reserpine as indicated by paper chromatography. Refluxing 3-isoreserpine obtained in this manner in acetic acid for 24 h gave an equilibrium mixture of the C-3 epimers from which a 15% yield of reserpine could be obtained. The separation of the two alkaloids from the acetic acid equilibrium mixture was easily accomplished by treatment with limited amounts of ethyl acetate at room temperature. 3-Isoreserpine is readily soluble while only moderate amounts of reserpine dissolve. An additional 5% of reserpine can be separated from the ethyl acetate soluble fraction by chromatography on a cellulose column impregnated with formamide using benzene-cyclohexane (1:1) as the eluting agent. Because of the stability of both reserpine and 3-isoreserpine in refluxing acetic acid, especially in the absence of oxygen, and the ease of separation of the two alkaloids, the unepimerized 3-isoreserpine can be recycled to enhance the overall conversion. The reserpine obtained by this process (m. p. 265–266°, $[\alpha]_D^{25} -118^\circ$ (chloroform); Analysis, Calculated for $C_{33}H_{40}N_2O_9$: C 65.11%; H 6.62%; N 4.60%; Found: C 65.29%; H 6.75%; N 4.63%) showed an identical infrared absorption spectrum and identical pharmacological activity to natural reserpine.

A 3-isoreserpine derivative has been transformed into a compound of the reserpine series by a second method. We have already reported⁵ that 3-isoreserpine acid forms an O-acetyl amino acid on treatment with acetic anhydride and pyridine at room temperature, indicating its reluctance to form a lactone. Reserpine acid lactone does not epimerize at C-3 and rings C, D, and E must thus be locked in the *trans-anti-cis* conformation. 3-Isoreserpine acid was therefore subjected to conditions favoring acid catalyzed isomerization and subsequent lactonization. The epimerization equilibrium can thereby be displaced in the desired direction. Treatment of isoreserpine acid hydrochloride (m.p. 277–279°C [dec.]; Analysis, Calculated for $C_{22}H_{28}O_5N_2 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2}H_2O$: C 59.24%; H 6.78%; N 6.28%; Found: C 59.13%; H 6.85%; N 6.28%) obtained by potassium hydroxide-methanol hydrolysis of methyl isoreserpate (m.p. 220°C)⁴ with refluxing acetic anhydride containing a small amount of acetic acid gave reserpine acid lactone (m.p. 310–314°C). The material was identified by comparison of melting point, mixed melting point and infrared spectrum with a sample of reserpine acid lactone.⁶ Similarly this transformation could be effected in better yield in refluxing collidine containing *p*-toluenesulfonic acid and phosphorus pentoxide. Reserpine acid lactone has been converted previously to reserpine in these laboratories⁶.

C. F. HUEBNER, M. E. KUEHNE,
B. KORZUN, and E. SCHLITTLER

Research Laboratories, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit, New Jersey, April 12, 1956.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewichtsmisch Reserpin/3-Isoserpin, das beim Kochen in Essigsäure erhalten wird, beträchtliche Mengen Reserpin

enthält. Durch Abtrennung der beiden Komponenten dieses Systems ist die Umwandlung von 3-Isoserpin in Reserpin ermöglicht.

3-Isoserpinsäure-hydrochlorid erfuhr in Acetanhydrid eine Isomerisation mit anschliessender Bildung des Lactons der Reserpinsäure.

Rauwolfia Alkaloids XXVI. Stereochemistry at C-17

Reserpine and deserpidine have been formulated with the C-17 methoxyl *trans* to the groups at C-16 and C-18 (α -oriented in the absolute sense)¹, as best evidenced by the postulated neighboring group participation of the C-17 methoxyl in the internal quaternization of methyl reserpate tosylate². This complex reaction occurs only under the comparatively rigorous conditions of refluxing collidine or dimethylformamide. In addition to the 30% yield of the inner quaternary salt and a smaller quantity of methyl anhydroreserpate, at least two other as yet unidentified crystalline products are formed. Therefore, corroboration for the assigned configuration of the C-17 methoxyl is desirable. This confirmation comes from two independent lines of evidence.

The previously reported product obtained from 3-*epi*- α -yohimbine in 70% yield by the action of *p*-toluenesulfonyl chloride in pyridine at 5°³ has been reexamined and found to be the quaternary tosylate I. It is soluble in hot water, is neutral, shows the infrared absorption bands characteristic of the *p*-tosylate ion at 1168, 1118, 1029, and 1007 cm^{-1} ⁴, and lacks the band in the 2632–2500 cm^{-1} region indicative of a $\rightarrow NH^+$ group.

Since compound I must almost certainly result from a concerted displacement of tosylate by N-4 with inversion at C-17, its ready formation under mild conditions and in good yield establishes the *trans* relationship of the groups at C-16 and C-17 in 3-*epi*- α -yohimbine. We have reported that deserpidinol yields α -yohimbyl alcohol on treatment with 48% hydrobromic acid by demethylation at C-17 and inversion at C-3⁵. Since under these conditions inversion at C-17 during the demethylation is very unlikely, the α -orientation of the C-17 methoxyl in deserpidine is also established.

The formation of internal quaternary ammonium salts during the tosylation of reserpinol and 3-isoreserpinol and the conversion to their crystalline iodides, IIa (m.p. 345–350° (dec.)⁶, $[\alpha]_D^{24} + 122^\circ$ (dimethylformamide); Analysis calculated for $C_{22}H_{29}N_2OI$: C 54.98%; H 6.10%; N 5.83%; Found: C 54.99%; H 6.30%;

¹ C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, Exper. 11, 303 (1955). – E. WENKERT and L. H. LIU, Exper. 11, 302 (1955). – E. E. VAN TAMELEN and P. D. HANCE, J. Amer. chem. Soc. 77, 4692 (1955).

² E. WENKERT and L. H. LIU, Exper. 11, 302 (1955). – E. E. VAN TAMELEN and P. D. HANCE, J. Amer. chem. Soc. 77, 4692 (1955).

³ F. E. BADER, D. F. DICKEL, C. F. HUEBNER, R. A. LUCAS, and E. SCHLITTLER, J. Amer. chem. Soc. 77, 3547 (1955).

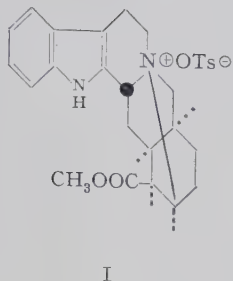
⁴ F. L. WEISENBORN and D. BURN, J. Amer. chem. Soc. 75, 259 (1953).

⁵ H. B. MACPHILLAMY, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, A. F. ST. ANDRÉ, and P. R. ULSHAFFER, J. Amer. chem. Soc. 77, 4335 (1955).

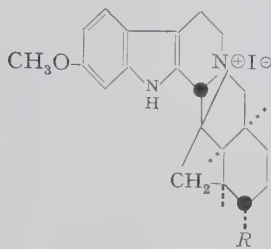
⁶ Erroneously reported as m.p. 315–316° (dec.) in paper C. F. HUEBNER and E. WENKERT, J. Amer. chem. Soc. 77, 4180 (1955).

⁵ C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, Exper. 11, 303 (1955).

⁶ L. DORFMAN, A. FURLENMEIER, C. F. HUEBNER, R. LUCAS, H. B. MACPHILLAMY, J. M. MUELLER, E. SCHLITTLER, R. SCHWYZER, and A. F. ST. ANDRÉ, Helv. chim. Acta 37, 59 (1953).

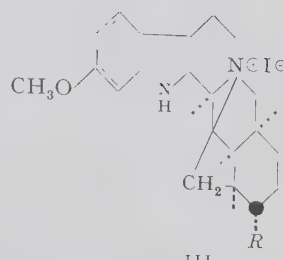


I



II

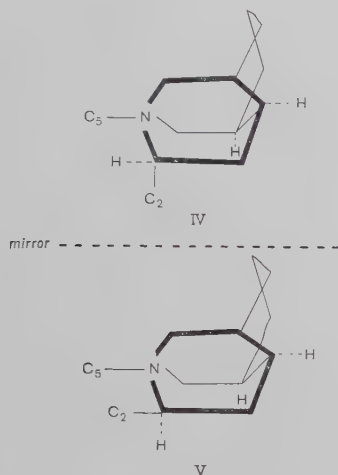
$a: R = \text{OCH}_3$
 $b: R = \text{H}$



III

$a: R = \text{OCH}_3$
 $b: R = \text{H}$

N 5.93%) and III *a* ($[\alpha]_D^{24} - 95^\circ$ in dimethylformamide)⁸, respectively, have already been reported⁷. An inspection of the three dimensional formulas, IV and V, corresponding to II *b* and III *b* reveals that these structures which lack the C-17 methoxyl are mirror images. This is the result of a new element of symmetry introduced into the molecule by the quinuclidine ring system. This is most clearly seen by rotation of V 120° toward the observer. The contribution of the C-17 methoxyl to the molecular rotation of II *a* and III *a* may be estimated as follows: Remembering that $[M]_D$ of II *b* and $[M]_D$ of III *b*, must be of equal magnitude and opposite in sign,



Such a system is present in II *a*. It is an α -oriented substituent at C-17 which would, according to these rules, have a positive rotational contribution.

We wish to acknowledge the invaluable contributions to this problem made by Dr. E. WENKERT, Iowa State College.

C. F. HUEBNER and D. F. DICKEL

Research Laboratories CIBA Pharmaceutical Products Inc. Summit, New Jersey, April 25, 1956.

Zusammenfassung

Bei der Behandlung von 3-*epi*- α -Yohimbin mit *p*-Toluol-sulfochlorid in Pyridin bei 5° wird mit grosser Leichtigkeit und ausgezeichneten Ausbeute ein quaternäres Tosylat erhalten. Dieser Befund, zusammen mit der bekannten sterischen Beziehung zwischen 3-*epi*- α -Yohimbin und Deserpidin, stützt die Annahme der *trans*-Konfiguration der Substituenten in 16- und 17-Stellung auch im Deserpidin. Ein Vergleich der optischen Drehungen von Reserpinderivaten spricht für analogen räumlichen Bau des Kohlenstoffatoms 17 im Reserpin.

The Biogenesis of the Morphine Alkaloids and Related Topics

Several theories have been advanced for the formation in nature of the typical skeleton of the morphine alkaloids. ROBINSON and SUGASAWA¹ suggested that sinomenine (I) is formed from a protosinomenine (II, $R = \text{H}$) by cyclisation; they synthesised the protosinomenine but obtained insufficient for further study. For the production of thebaine (III) ROBINSON¹ suggested closure of the 4:5-oxide bridge by the dehydration of a 4:5-dihydroxy-compound. The necessary intermediate for this (IV) would, however, have to be produced by the cyclisation of an oddly substituted *isoquinoline*, and the suggestion was accordingly made¹ that base (V) (obtained from the same intermediates as protosinomenine by closure of the *isoquinoline* ring *ortho* instead of *para* to the hydroxyl group) cyclises to (VI), which then undergoes reversal of the substituents at C₍₁₄₎ and C₍₁₃₎ giving the base (IV).

More recently SCHÖPF², on the basis of the presumed oxidation of *p*-cresol to the ketone (VII)³, suggested



¹ R. ROBINSON and S. SUGASAWA, J. chem. Soc. 3163 (1931); 280 (1933). – R. ROBINSON, J. chem. Soc. 1079 (1936); Nature 160, 815 (1947).

² C. SCHÖPF, Naturwissenschaften 11, 241 (1952).

³ R. PUMMERER, D. MELAMED, and H. PUTTFARCKEN, Ber. dtsh. chem. Ges. 55, 3116 (1922). – R. PUMMERER, H. PUTTFARCKEN, and P. SCHOFFLOCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. 58, 1808 (1925).

⁷ C. F. HUEBNER and E. WENKERT, J. Amer. chem. Soc. 77, 4180 (1955).

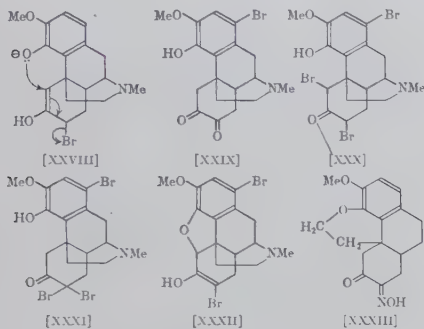
⁸ Analysis reported in paper C. F. HUEBNER and E. WENKERT, J. Amer. chem. Soc. 77, 4180 (1955).

⁹ D. K. FUKUSHIMA and T. F. GALLAGHER, J. Amer. chem. Soc. 73, 196 (1951).

¹⁰ W. KLYNE and W. M. STOKES, J. chem. Soc. 1954, 1979.

¹⁰ C. SCHÖPF and T. PFEIFFER, *Ann.* 483, 157 (1930).

represented as involving bromination at the less hindered position 7, followed by the allylic expulsion of a bromide ion (XXVIII), and indeed there is good evidence that bromination in fact occur at position 7. SCHÖPF has shown¹¹ that the treatment of tribromodihydrothebainone with potassium carbonate in methanol affords the antipode of 1-brosinomeninone (XXIX), and represented this as involving 1:5:7-tribromodihydrothebainone (XXX). Although such $\alpha\alpha'$ -dibromocompounds are known in the steroid series a much more reasonable hypothesis in this case is that the diketone (XXIX) arises from the 7:7-dibromo-compound (XXXI); the production of the diketone (XXIX) by the bromination of dihydrocodeinone presumably proceeds through the 7:7-dibromide (XXXI), formed by the 1:4-addition of hydrogen bromide to the allylic ether system of the 7-bromo-enol (XXXII).



Mono-isonitrosothebenone, allotted a 7-isonitroso-structure by WIELAND and KOTAKE¹², was thought by RAPOPORT and LAVIGNE¹³ to be a 5-isonitroso-compound, on the grounds that the mechanism of isonitroso-compound formation is similar to that of bromination; however the arguments outlined above make the 7-substituted structure (XXXIII) (which is more satisfactory on steric grounds, as reaction would be expected to occur at position 7 rather than at the much more hindered position 5) very much more probable.

K. W. BENTLEY

The Chemistry Department, The University, Aberdeen,
February 17, 1956.

Zusammenfassung

Die biologische Entstehung von Thebain und Sino-menin aus zwei enantiomorphen Formen von Laudanin wird zur Diskussion gestellt. Der Schluss der 4,5-Oxyd-Brücke bei 7-Hydroxy-, 7-Amino-, Bromo- und 6-Oximino-Verbindungen verläuft analog dem vorgeschlagenen, biologischen Entstehungsweg. Es wird angenommen, dass die Bromierung der 6-Keto-7:8-dihydro-Verbindungen aus der Morphingruppe in Stellung 7 vor sich geht.

¹¹ C. SCHÖPF, T. PFEIFFER, and H. HIRSCH, Ann. 492, 213 (1932).
¹² H. WIELAND and M. KOTAKE, Ann. 444, 69 (1925).
¹³ H. RAPOPORT and J. B. LAVIGNE, J. Amer. chem. Soc. 75, 5329 (1953).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen
von Pollenschläuchen

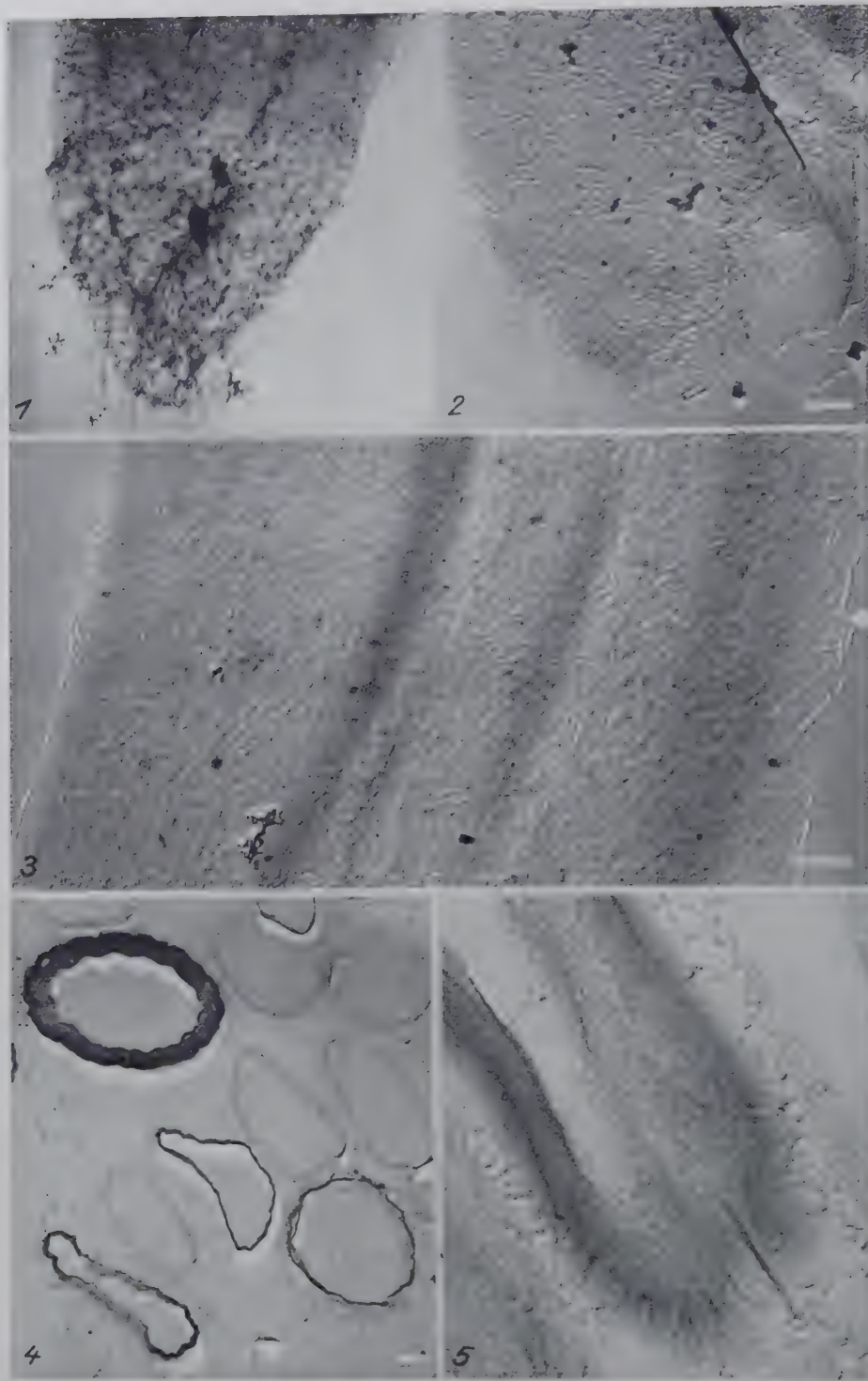
Die Selbststerilitätsreaktion äussert sich bei *Petunia* in einer Hemmung des Wachstums der Pollenschläuche im Griffelgewebe. Biochemische Untersuchungen (LINSKENS¹) zeigten, dass daran Stoffwechselprozesse beteiligt sind. Zur Ergänzung dieser Befunde untersuchten wir die Feinstruktur der Pollenschlauchmembranen im Elektronenmikroskop, um abzuklären, ob bei der Wachstumshemmung auch eine Veränderung der Wandtextur erfolgt.

Methode. Für alle Präparate dienten als Griffelspender Pflanzen von *Petunia hybrida media vulgaris* des Klons T₃U, die die Selbststerilitätsallele S3S3 enthalten. Zur Bestäubung wurden Pollen der gleichen Pflanzen benutzt, also Selbstbestäubung durchgeführt. Die Griffel entfernten wir 12 h nach der Bestäubung und fixierten sie in 1% Osmiumsäure. In den Quer- und Längsschnitten durch diese Griffel gelang es aber nicht, die Pollenschläuche mit Sicherheit von den Leitzellen zu unterscheiden. Die Griffel wurden daher vor dem Einbetten im Methacrylat kurz in 5% NaOH und 5% HCl gekocht, um das Pektin aus den Leitzellen zu entfernen. Wie aus den Abbildungen 4 und 5 hervorgeht, erscheinen dann die Pollenschläuche wegen der starken Kutinisierung kontrastreicher als die dünnen Zellwände der Leitzellen.

Zum Vergleich mit diesem im Griffel gewachsenen Pollenschlauch untersuchten wir auch die Wandtextur von frei gewachsenen Schläuchen. Zu diesem Zwecke liessen wir die Pollen der gleichen *Petunia*-Pflanzen in einer Feuchtkammer auf einer dünnen Schicht Rohrzuckeragar (0,5% Agar, 10% Rohrzucker, 0,01% Borsäure) keimen. Diese Schläuche wurden nach dem Fixieren durch Hydrolyse der Agarschicht mit verd. HCl isoliert und anschliessend abzentrifugiert. Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass durch diese Behandlung die nichtzellulosischen Wandsubstanzen noch nicht entfernt worden sind. Erst die anschliessende Erwärmung in 10% KOH löste die Inkrusten vollständig heraus (Abb. 2). Zur Untersuchung der Membranstruktur im Elektronenmikroskop wurde ein Tropfen der gewaschenen und angereicherten Pollenschlauchsuspension auf den Objektträger übertragen und nach dem Antrocknen mit Chrom beschattet.

Ergebnisse. Nach BOURGE² soll die Pollenschlauchmembran hauptsächlich aus Zellulose bestehen und als Inkrusten Pektin enthalten. Bei den auf Agar gekeimten Schläuchen tritt aber bei der Färbung mit Chlorzinkjod die violette Zellulosereaktion oft erst nach Stunden ein (VOGEL³), was darauf hindeutet, dass die Zellulose vollständig durch nichtzellulosische Stoffe maskiert ist. Die Abbildungen 1 und 4 zeigen, dass diese Substanzen bei schwacher Hydrolyse nicht abgebaut werden und daher nicht mit Pektin identisch sind. Solange sich der Schlauch in lebhaftem Wachstum befindet, ist die Spitze weniger stark inkrustiert als der hintere Teil des Schlauches (Abb. 1). Tritt aber ein Wachstumsstillstand ein, so wird auch die Spitze mit jenen Stoffen, die die Eigenschaften von Kutin aufweisen, imprägniert. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen von SCHOCH-BODMER⁴, dass bei wachsenden Schlauchspitzen eine Plasmolyse nicht möglich ist, aber nach einem Wachs-

¹ H. F. LINSKENS, Z. Bot. 43, 1 (1955).
² Ph. BOURGE, Cellule 8, 47 (1892).
³ A. VOGEL, Die Zellwand der Pollenschläuche. Diplomarbeit Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, 1950.
⁴ H. SCHOCH-BODMER, Ber. schweiz. bot. Ges. 55, 154 (1945); Vjschr. naturf. Ges. Zürich 92, 43 (1947).



1 Spitze eines auf Agar gewachsenen Pollenschlauches. (Vergrößerung 3000:1.) – 2 Pollenschlauchspitze nach dem Weglösen der Inkrusten. (Vergrößerung 7000:1.) – 3 Mittelstück eines Pollenschlauches. (Vergrößerung 9000:1.) – 4 Schnitt durch einen Griffel mit Pollenschläuchen und Leitzellen (Pektin weggelöst). (Vergrößerung 4000:1.) – 5 Längsschnitt durch den Griffel mit Pollenschlauch. (Vergrößerung 3000:1.)

tumsstillstand sofort erfolgt. Offenbar zieht sich das Plasma nach der Kutinisierung aus der Zellwand zurück.

Über die Anordnung der Zellulosefibrillen in den Pollenschläuchen ist bereits eine Untersuchung von O'KELLEY und CARR⁵ erschienen. Nach diesen Autoren

besteht die Membran im basalen Teil aus einem Fibrillensystem mit Streuungstextur. An der Spitze dagegen fanden sie nur stäbchenförmige Partikel, welche als Bausteine der Zellulosefibrillen angesehen wurden. Eine zusammenhängende Membran soll sich erst hinter der Spitze ausbilden. Nach unseren Ergebnissen (Abb. 2, 3, 5) ist aber kein solcher Unterschied in der Fibrillenstruk-

⁵ J. C. O'KELLEY and P. H. CARR, Amer. J. Bot. 41, 261 (1954).

tur vorhanden. Die von O'KELLEY und CARR⁵ beobachteten granulären Teilchen sind unseres Erachtens nicht Zellulosepartikel, sondern unvollständig entfernte Inkrusten.

Die an der Spitze sehr dünne Zellulosemembran wird nach hinten durch Anlagerung neuer Stränge verstärkt, wobei aber die ursprüngliche Streuungstextur erhalten bleibt (Abb. 3). Nach SCHOCH-BODMER⁴ ist das Flächenwachstum nur auf die ersten 4–7 μ einer Schlauchspitze beschränkt. Eine Umorientierung der Fibrillen erfolgt dann nicht mehr, weil die Membran keine nachträgliche Dehnung erleidet. Vereinzelt fanden wir in den Querschnitten durch die Griffel auch Pollenschläuche mit zweischichtigen Membranen, wobei die innere Lamelle ebenfalls eine Streuungstextur aufwies (Abb. 4). Wie bei den meisten Pflanzenzellen kann auch hier eine nachträgliche Verstärkung der Membran durch eine neue Schicht erfolgen. Bei Zellen mit extremem Spitzenwachstum bleibt also die Fähigkeit der Membranbildung nicht nur auf diesen Abschnitt beschränkt. Als weitere Membranbildungen müssen wir auch die Calluspfpfen im hinteren Teil der Schläuche ansehen. Eine Innenstruktur dieser Gebilde konnten wir in den Dünnschnitten nicht erkennen; sie erschienen immer homogen.

Vergleichen wir nun die im Griffel gewachsenen Pollenschläuche mit den auf Agar gekeimten, so erkennen wir, dass durch die Wachstumshemmung die Wand dichter geworden ist (Abb. 2, 5). Dieser Befund deutet darauf hin, dass bei gehemmtem Wachstum je Flächeneinheit mehr Fibrillen deponiert werden als in den frei wachsenden Pollenschläuchen. Eine Änderung in der Anordnung der Fibrillen erfolgt dabei nicht, denn die Streuungstextur bleibt immer erhalten.

Im Lichtmikroskop zeigen die Leitzellen des Griffels eine kollenchymartige Struktur. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4) ersieht man, dass die Zellwand nur aus einer Primärmembran besteht. Typische Kollenchymzellen mit abwechselnden Schichten aus Pektin und Zellulose fehlen ganz. Die kollenchymähnliche Struktur der Leitzellen ist daher nur auf die abnorm stark ausgebildete Mittellamelle zurückzuführen.

K. MÜHLETHALER und H. F. LINSKENS

Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule (Laboratorium für Elektronenmikroskopie), Zürich, den 19. März 1956.

Summary

Electron micrographs were made of the cellulose part of the cell walls of pollen tubes of *Petunia hybrida*, grown in selfed self-sterile plants and on agar plates. In sterile plants the tubes showed denser membranes but the orientation of the cellulose strands is the same as in cells germinated on agar.

Electron Microscopy of Thin Sections of Reticulocytes*

Reticulocytes are young anucleated erythrocytes with a basophilic structure evidenced by vital stainings. This structure has been the subject of study in recent

years¹, and it is considered to be the result of nucleic acid precipitation during the staining process². BRAUNSTEINER and BERNHARD³ could not detect filaments in reticulocytes examined in the electron microscope following haemolysis made in suspension in distilled water. Electron microscope studies in this laboratory have, however, shown the existence of filaments inside reticulocytes (Fig. 1 and 2) in blood smears haemolyzed after partial drying, or circular forms when haemolysis was made in suspension in distilled water. Forms that can be considered intermediate between filaments and circular forms were obtained by modifying the haemolysis conditions⁴.

In this communication, evidence is presented that the filaments previously described in haemolyzed reticulocytes also exist in intact reticulocytes and that they have the characteristic mitochondrial structure. This is shown by electron microscopy⁵ and is brought out by the staining properties of mitochondria.

To increase the number of reticulocytes in blood, 5–6 ml heart bleedings were made in 350–400 g guinea-pigs, 3 days before preparation. No nucleated erythrocytes were observed in these preparations. The percentage of reticulocytes in red cells was about 8% in both smears for optical microscopy and electron microscope preparations.

Supra-vital staining of reticulocytes as performed with Janus green B showed the filaments and granules in blue-green. Filaments are also to be seen with the dye in smears of these stained cells when these have been haemolyzed after partial drying. Staining of haemolyzed smears was also made according to ALTMANN and REGAUD's methods, by which reticulocytes show the filaments stained in red by fuchsin acid and dark blue by haematoxylin. Hence, the conclusion can be drawn that both supra-vital staining and haemolysis after drying exhibit the same filamentous structure and that these filaments possess an affinity for mitochondrial stains.

Samples for electron microscopy were prepared by suspending red cells of a few drops of blood, immediately after bleeding, in 1% buffered (pH = 7.2–7.4) isotonic osmic acid solution and fixing for 30 min; dehydration and embedding in a mixture of methyl and butyl methacrylate were carried out according to PALADE⁵. Sections were cut with a Porter-Blum microtome and examined in a Siemens electron microscope ÜM 100b at 60 kV at 6700 $\times$ magnification.

Reticulocyte sections were identified in the electron microscope by the difference from the characteristic aspect of erythrocytes and leucocytes⁶. Erythrocytes are homogeneous and possess great scattering power for electrons due to high haemoglobin content, whereas reticulocytes appear heterogeneous and less dense to electrons (Fig. 3). A continuous transition in appearance can be observed from reticulocytes to adult erythrocytes, which is possibly related to the increase in haemoglobin

¹ M. BESSIS, *Traité de Cytologie Sanguine* (Masson & Cie., Paris 1954), p. 219. – H. BRAUNSTEINER and W. BERNHARD, *Acta haematol.* 3, 167 (1950).

² P. DUSTIN, JR., *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1, 144 (1947). – W. KOSENOW, *Acta haematol.* 7, 360 (1952).

³ H. BRAUNSTEINER and W. BERNHARD, *Acta haematol.* 3, 167 (1950).

⁴ A. BRUNNER JR. and A. VALLEJO-FREIRE, *Exper. Cell Res.* 10, 55 (1956).

⁵ G. E. PALADE, *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188 (1953).

⁶ J. KAUTZ and Q. B. DE MARSH, *Blood* 9, 24 (1954); *Symposium sur la Microscopie Electronique des Cellules du Sang par la Méthode des Coupes*, *Rev. Hématol.* 10, 265 (1955).

* This study has been aided by a grant from the Conselho Nacional de Pesquisas (Brazil).

content. Inside the reticulocytes are found round, long bodies, which constitute the filaments observed in the haemolyzed smears. All bodies show the characteristic

corresponding to vacuoles, the existence of which in reticulocytes was reported by BESSIS⁷ using the phase-contrast microscope.

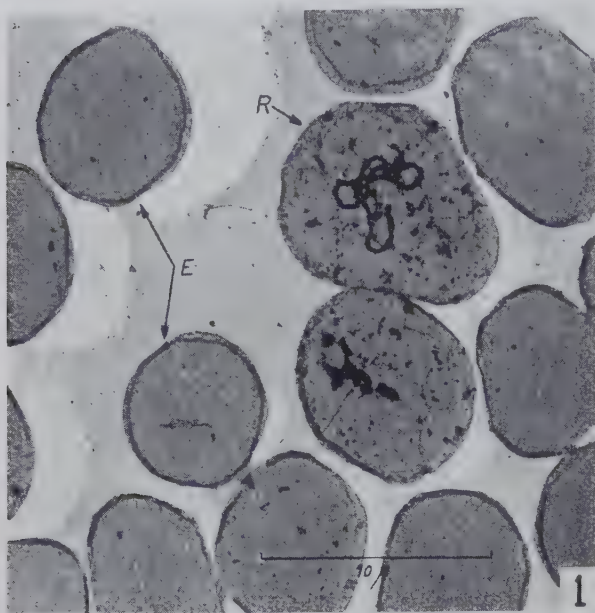


Fig. 1.—Electron micrograph of a smear of reticulocyte *R* and erythrocytes *E*. Haemolysis after partial drying.



Fig. 3.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte *R* showing mitochondria *m* and erythrocytes *E*. Osmic acid fixation in isotonic medium.

mitochondrial structure (Fig. 4), with a limiting membrane and intramitochondrial bands or lamellae⁸; arrow *a* points to a section along the long axis of one of these long bodies, and arrows *b* to inclined cross-sections;

Changes in volume of mitochondria in hypotonic media have been observed by LEWIS and LEWIS⁸ and recently by ZOLLINGER⁹ with the phase-contrast microscope. Special attention has thus been paid to the salt concen-

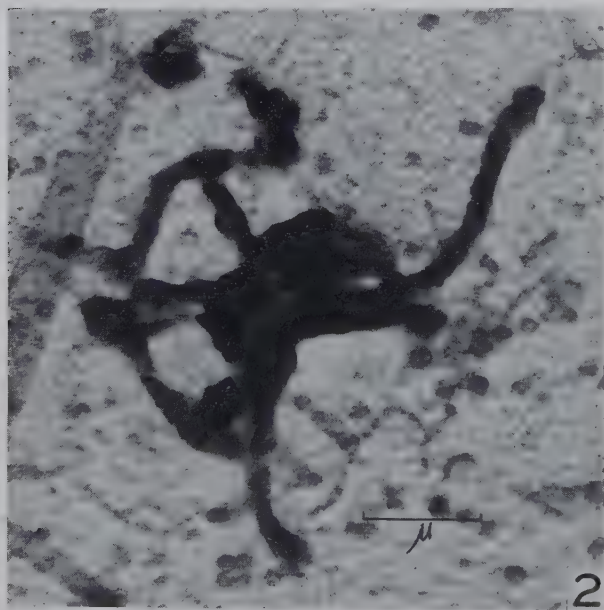


Fig. 2.—Electron micrograph of the filaments inside the reticulocyte. Haemolysis after partial drying. Shadowed with chromium, 15°.

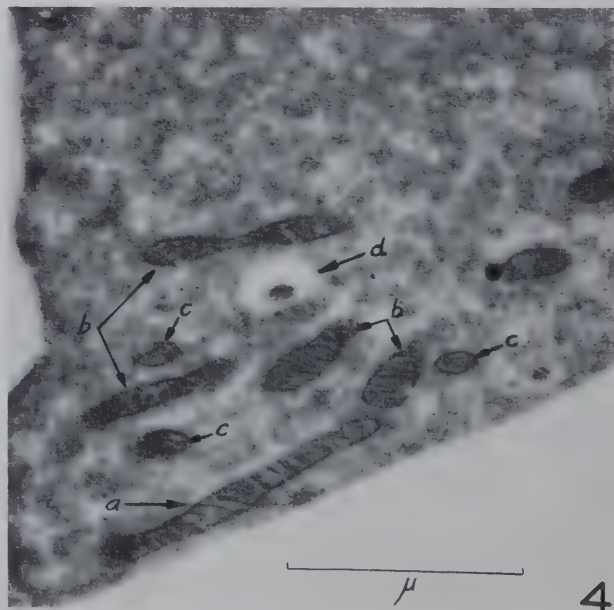


Fig. 4.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte. Arrows *a*, *b* and *c* point to mitochondria; arrow *d* to a vacuole. Osmic acid fixation in isotonic medium.

arrows *c* point to cross-sections of long or granular mitochondria; arrow *d* points to an elliptical, transparent region observed in many reticulocyte sections, possibly

⁷ M. BESSIS, *Traité de Cytologie Sanguine* (Paris, 1954), p. 219.

⁸ M. R. LEWIS and W. H. LEWIS, *Amer. J. Anat.* 17, 339 (1915).

⁹ H. U. ZOLLINGER, *Amer. J. Path.* 24, 569 (1948).

trations in the fixation medium when preparing reticulocytes for electron microscopy. Figure 5 shows a reticulocyte fixed by formalin in hypotonic medium and stained with phosphotungstic acid, giving evidence of the changes that occur with the mitochondrial filaments in which the internal bands are still discernible, but already show an increase in diameter and in the distance between the mitochondrial bands. These observations on the mitochondrial nature of the filament add further support to the hypothesis, suggested in a previous paper⁴, that the different morphology observed in reticulocytes haemolyzed under various conditions is due to osmotic effects. The aspect of reticulocytes observed by BRAUNSTEINER and BERNHARD³ in electron microscope preparations after haemolysis in distilled water can also be explained by osmotic effects.

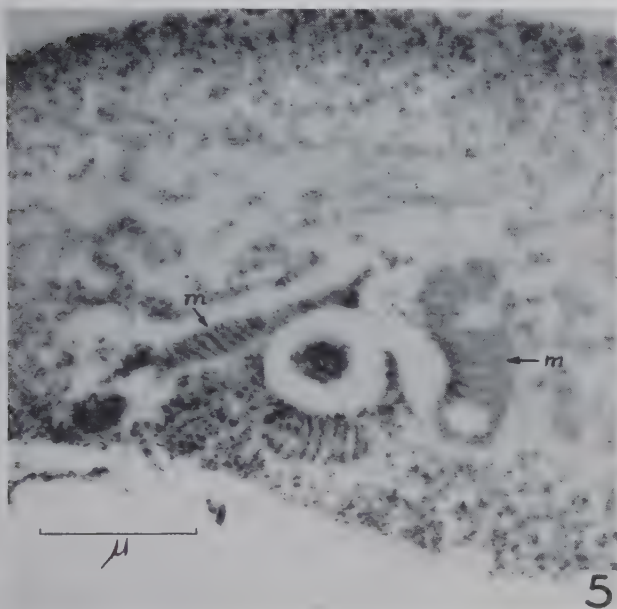


Fig. 5.—Electron micrograph of a thin section of reticulocyte with swollen mitochondria *m*. Formalin fixation in hypotonic medium. Stained with phosphotungstic acid.

From the above observations, it is strongly suggested that the "substantia granulo-filamentosa" in bleeding anaemias is a pre-existent structure inside the reticulocyte and that it is of mitochondrial nature or can originate from mitochondria during the maturation process of the cell.

A. BRUNNER jr., A. VALLEJO-FREIRE,
and P. SOUZA SANTOS

Laboratorio de Virus, Instituto Butantan, Sao Paulo,
Brasil, March 6, 1956.

Zusammenfassung

Retikulozyten von Meerschweinchen, in denen Anämie durch Blutentzug hervorgerufen worden war, wurden in Dünnschnitten elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden dieselben filamentösen Körper mit charakteristischer Mitochondrienstruktur, die auch nach teilweiser Trocknung hämolysierter Ausstriche von Retikulozyten auftreten, gefunden. Diese Filamente formen die durch Vitalfärbung (Janusgrün B) dargestellte innere

Struktur der Retikulozyten und besitzen Affinität zu den spezifischen Mitochondrienfarbstoffen. Auf Grund dieser Feststellungen wird die Natur der «substantia granulo-filamentosa» für mitochondrienartig und somit präexistent gehalten.

Action de la triéthylènemélatamine sur les mitoses de segmentation de l'œuf de *Pleurodèle*

L'action sur la mitose de la 2,4,6-triéthylèneimino 1,3,5-triazine ou triéthylènemélatamine (TEM) a fait l'objet des travaux de BIESELE *et col.*¹, sur des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa*, de PLUMMER *et col.*², sur des cultures de fibroblastes de Poulet, de ROSE, HENDRY et WALPOLE³, sur le testicule du Rat, et de ROSS⁴, sur *Vicia faba*. MEIER, DESAULLES et LOUSTALOT⁵ ont comparé son action inhibitrice sur le développement du granulome expérimental et sur celui de diverses tumeurs du Rat.

Les œufs en segmentation de *Pleurodeles waltlii* Michah. ont été traités par des solutions de TEM, échelonnées de $1/400$ à $1/12000$. Ils ont été fixés, après des temps variables, au sublimé-cobalt, inclus au méthyl-salicylate de celloïdine et colorés par la méthode de FLEMING, suivant une technique qui a été exposée ailleurs⁶. Nous résumerons les conclusions tirées de l'examen de plus de 300 œufs, coupés en série.

1° *Agglutination des œufs*. La TEM, aux concentrations de $1/200$ à $1/2000$, produit une forte agglutination des œufs, qui se collent entre eux par leur membrane vitelline. Ce pouvoir agglutinant disparaît dans les solutions vieillies, dont l'action sur les chromosomes persiste, à peine atténuée, et aux concentrations inférieures à $1/4000$.

2° *Action sur le clivage et sur la polarité*. Pendant les premiers cycles de segmentation, la TEM n'inhibe pas la segmentation, même si elle commence à pénétrer dans le cytoplasme aussitôt après la fécondation. Elle ne modifie pas la polarité du fuseau, ni l'aspect des sphères et des asters, sauf cependant dans deux cas: 1° quand elle agit aussitôt après la fécondation et que les œufs sont particulièrement sensibles: on obtient alors des morulas (à 16 blastomères par exemple), qui contiennent seulement 1 ou 2 noyaux, dépourvus de polarité; 2° à la fin de la segmentation, quand la puissance des pôles diminue normalement, ce qui rend le fuseau plus vulnérable. Dans les cas intermédiaires, on peut observer une dissociation entre la segmentation et l'activité des pôles, qui continue, d'une part et la chromatine altérée, qui évolue difficilement, d'autre part, d'où les mitoses pluripolaires (Fig. 1) et parfois la libération de multiples cytasters. La force active des pôles est cependant suffisante pour que des cycles mitotiques successifs se poursuivent jusqu'à la fin de la segmentation.

3° *Action de rupture des chromosomes*. La TEM est essentiellement un agent de rupture des chromosomes dans

¹ J. J. BIESELE, F. S. PHILIPS, J. B. THIERSH, J. H. BURCHENAL, S. M. MUCKLEY et C. C. STOCK, *Nature* 166, 1112 (1950).

² J. L. PLUMMER, L. T. WRIGHT, G. ANTIKADJIAN et S. WEINTRAUB, *Cancer Res.* 12, 796 (1952).

³ F. L. ROSE, J. A. HENDRY et A. L. WALPOLE, *Nature* 165, 993 (1950).

⁴ W. C. J. ROSS, *Nature* 165, 808 (1950).

⁵ R. MEIER, P. A. DESAULLES et P. LOUSTALOT, *Exper.* 12, 61 (1956).

⁶ P. SENTEN, *Arch. Anat. micr.* 43, 80 (1954); sous presse (1956).

les mitoses de segmentation de l'œuf. Elle a cette propriété en commun avec les phénols⁷, l'ypérite à l'azote⁸ et la patuline⁹. Ces corps possèdent en plus une action sur le fuseau, que la TEM n'a qu'exceptionnellement. Elle ne provoque pas la gélatinisation réversible des chromosomes, particularité remarquable de l'action du *para-aminosalicylate de sodium*. A mesure que la concentration s'abaisse ($1/4000$ à $1/12\,000$), les ruptures, dues à la TEM, deviennent moins nombreuses et par conséquent les fragments plus longs.

La première manifestation de l'action sur les chromosomes n'est pas leur fragmentation, mais le «pseudo-chiasma» (3^{me} h à $1/500$, 5^{me} h à $1/1000$ pour des œufs traités après la fécondation). Aussitôt après, apparaissent les ruptures, qui deviennent vite très nombreuses et sont particulièrement visibles dans les ponts dicentriques, à l'anaphase. L'accrolement précède donc la fragmentation, ce qui est en accord avec les conceptions de GOLDACRE, LOVELESS et ROSS¹⁰ sur le rôle joué par la liaison en croix (cross-linkage) de chaînes moléculaires protéiques ou nucléoprotéiques. On ne peut donc pas distinguer un effet primaire «physiologique» et un effet secondaire «génétique», comme dans l'action des rayons X.

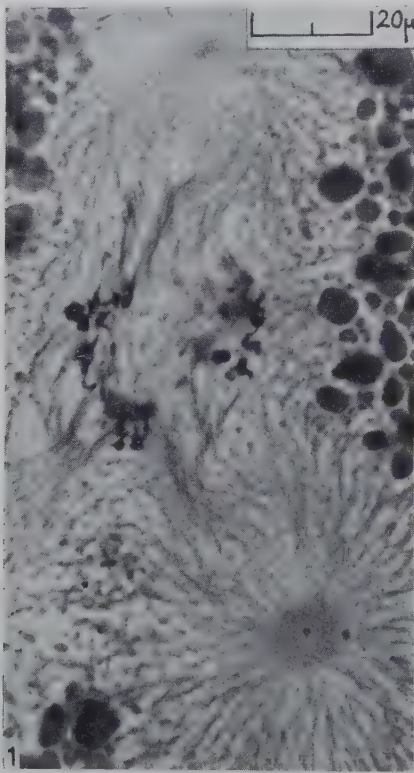


Fig. 1. Œuf traité à 2 blastomères par TEM $1/400$, 6 h, et devenu morula. Partie d'une mitose pluripolaire, avec granules agglutinés.

Ces ruptures peuvent être visibles dès la prophase de la 1^{re} mitose de segmentation. Elles donnent des bâtonnets, des granules et plus tard des anneaux, par réunion secondaire des extrémités rompues; ces fragments se disposent en chapelets («Perlenstruktur») (Fig. 2), ne

s'écarteront jamais du fuseau et ne sont pas libérés dans l'hyaloplasme: il reste donc probablement entre eux un filament achromatique non rompu. Dans les cas favorables, ils apparaissent comme symétriques et identiques pour deux chromatides-filles, ce qui démontre que les ruptures ne se sont pas produites au hasard, mais en des points prédéterminés par la structure normale du chromosome.

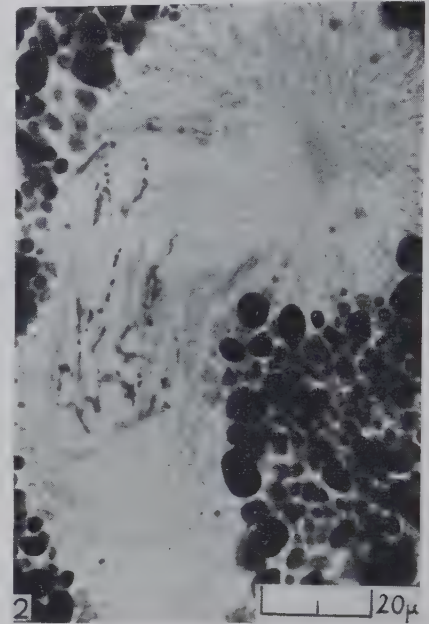


Fig. 2. Œuf de la même expérience. Torsion du fuseau et chapelets de grains.

4° *Actions secondaires sur le fuseau.* Ce sont des anomalies de la région équatoriale du fuseau, plicatures, coudures, torsions des fibres, qui manifestent un ramollissement prématuré, normalement contemporain de l'anaphase. Le fuseau est étalé et attiré transversalement, entraînant avec lui des fragments, souvent agglutinés: l'équateur est le seul endroit où les éléments acentriques tendent à s'écarter du fuseau. Ces anomalies deviennent moins nettes aux faibles concentrations.

Si l'action de la TEM est électivement chromosomique pendant la segmentation, elle cesse de l'être dans la gastrula, l'embryon et la jeune larve. Dans les mitoses épithéliales de celle-ci, l'action sur le fuseau devient primordiale (mitoses monopolaires) et les ruptures, beaucoup plus rares: il y a une inversion totale de l'action.

P. SENTEIN

Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Montpellier, le 17 Mars 1956.

Summary

Triethylenemelamine ($1/400$ to $1/12\,000$) induces pseudochiasmata and chromosome-breakage in the egg-segmentation mitoses of *Pleurodeles waltlii* Michah. The primitive effect is stickiness, breakages appear subsequently, but without an interval of time between: the primary „physiological” and the secondary „genetical” effect cannot be separated. There are points of breakability, which explains the symmetry of certain fragments. The action is inverted in the epidermal cells of the larvae, where spindle alterations are prominent. Cytodieresis is never inhibited.

⁷ P. SENTEIN, C. r. Assoc. Anat. 41, 445 (1955).

⁸ P. SENTEIN, C. r. Soc. Biol. 149, 167 (1955).

⁹ P. SENTEIN, C. r. Soc. Biol. 149, 1621 (1955).

¹⁰ R. J. GOLDACRE, A. LOVELESS et W. C. J. ROSS, Nature 163, 667 (1949).

The Growth of the Tail in Urodele Larvae

In amphibian larvae, the component parts of the tail-bud are to be found in the neural plate stage as separate cell territories. The posterior tip of the prospective spinal cord lies in the neural plate at some distance before the blastopore. The material for the tail somites occupies the hindmost part of the neural plate and continues into the invaginated chorda-mesoderm round the dorsal and the lateral blastoporal lips (BIJTEL and WOERDEMAN¹, BIJTEL², and others). By morphogenetic movements, these cell territories are brought together into the tail-bud. As regards to the outgrowth of the tail-bud, some investigators have seen in the notochord the principal "motor" (PASTEELS³, DALCO⁴). Others, on the contrary, have concluded from their experiments that the elongation of the tail can take place independently of the notochord (DEVILLERS⁵, BYTINSKI-SALZ⁶).

The results of my own experiments, made in former years on urodele larvae, have given me the impression that the neural tube and the somites play the most active part, whereas the notochord functions as a splint. In recent years I have tried to complete the series of my experiments on larvae of *Amblystoma mexicanum* and *Triton taeniatus*. The results, which are briefly reported, here, have strengthened me in my conviction.

(1) If the hindpart of the neural plate containing the material for the tail neural tube and the tail somites is extirpated in the wide open neural plate stage, the tail either does not grow out at all or a small tail develops, dependent on the length of the part which has been extirpated and on its extension with regard to the blastopore (Fig. 1a).

(2) When the same part of the neural plate is grafted into the side of another larva, a tail-like structure develops from the graft. It has an axis formed by the neural tube surrounded by somites (Fig. 1b).

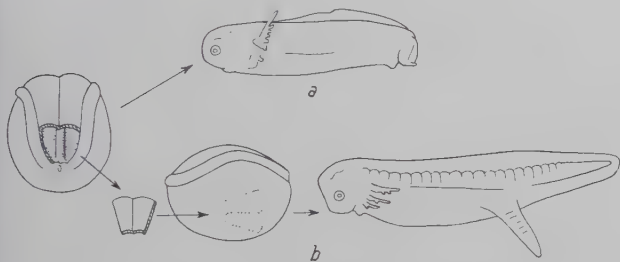


Fig. 1. Extirpation and transplantation of the hindpart of the neural plate containing tail neural tube and tail somites. a Donor; b Host.

(3) When the tail notochord is extirpated in the neural plate stage, in the first stages of development the tail does not show many points of difference from the normal tail. In more advanced stages, however, it becomes evident that the tail cannot reach its normal length without a notochord (Fig. 2a).

(4) When the hindpart of the notochord is transplanted into the side of another larva, an irregular mass of

notochord tissue develops. As a rule the piece of notochord develops into a coiled-up form (Fig. 2b).

(5) If the hindpart of the wide open neural plate containing the material for the tail neural tube and the tail somites is removed, rotated 180° and re-implanted at the same spot, the direction of the outgrowing tail is determined by the direction in which the graft grows out.

(6) If, on the contrary, the tail notochord anlage is re-implanted after a rotation of 180° in the same place, the tail grows out in the normal direction.

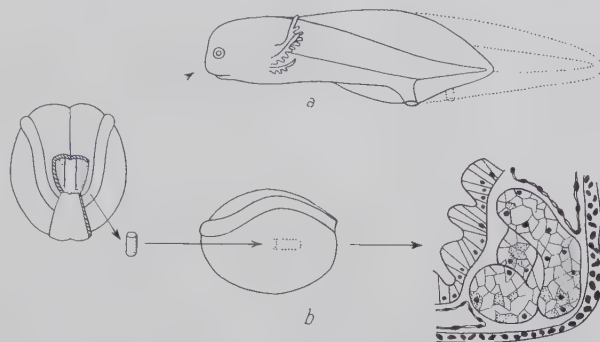


Fig. 2.—Extirpation and transplantation of the hindpart of the notochord. a Donor; b Host.

From the results of these experiments it becomes clear that the first outgrowth of the tail is brought about by the outgrowth of the material for the neural tube and of that for the somites. The muscle cells of the developing myotomes have in themselves an autonomous stretching potency. Moreover, it is the combination of the neural and the mesodermal tissues which determines, in the first instance, in which direction the tail grows out. These two tissues, however, require an axis, a sort of splint, to retain the obtained length. In very early stages, the neural tube can play this part, but later on the notochord is necessary to take over this rôle. The notochord has in itself a potency for expansion, but its stretched form is moulded with the help of the surrounding tissues, especially with that of the somites.

J. HUBERTHA BIJTEL

Department of Anatomy and Embryology of the State University of Groningen, The Netherlands, February 29, 1956.

Zusammenfassung

Aus den Resultaten der Versuche an Urodelenlarven folgt, dass die Entwicklung des Schwanzneuralrohrs und der Schwanzsomiten das Auswachsen des Schwanzes hervorruft. Die zwei genannten Gewebe brauchen eine Art Schiene, um die erworbene Länge zu behalten. In den ersten Stadien der Schwanzentwicklung kann das Schwanzneuralrohr als Schiene dienen, später aber ist die Anwesenheit der Chorda notwendig, um diese Rolle zu übernehmen. Die sich entwickelnde Chorda hat zwar eine Fähigkeit zur Expansion, aber ihre gestreckte Form wird modelliert mit Hilfe der sie umgebenden Gewebe, besonders der Somiten. Die Richtung, in welcher der Schwanz auswächst, wird nicht durch die Chorda bestimmt, sondern durch die Kombination von Schwanzneuralrohr und Schwanzsomiten.

¹ J. H. BIJTEL and M. W. WOERDEMAN, Proc. roy. Acad. Sci. 31, 1030 (1928).

² J. H. BIJTEL, Roux'Arch. Entw.-Mech. 125, 448 (1951).

³ J. PASTEELS, Ann. Soc. roy. zool. Belg. 70, 33 (1939).

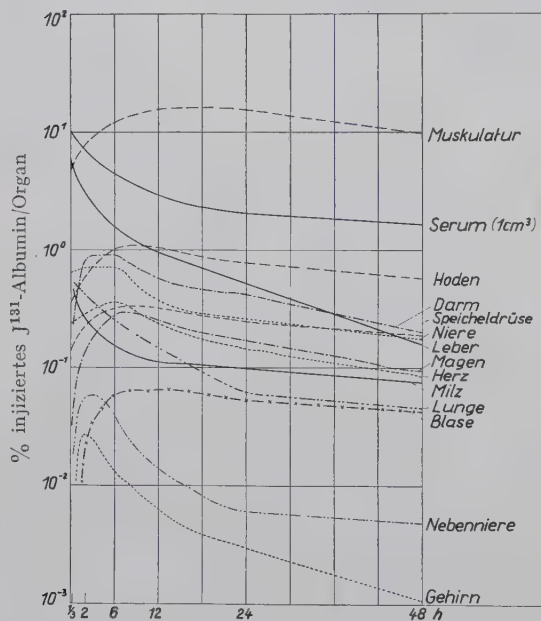
⁴ A. DALCO, L'oeuf et son dynamisme organisateur (Ed. Albin Michel, Paris 1941).

⁵ C. DEVILLERS, C. r. Acad. Sci. Paris 227, 25, 1411 (1948).

⁶ H. BYTINSKI-SALZ, C. r. 12^e Congrès Int. Zool., Lisbonne 1935.

Lokale Kapillarpermeabilität und austauschbares Albumin in verschiedenen Organen der Ratte

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die einzelnen Plasmaeiweissfraktionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit sowohl aus dem Gefäßsystem austreten, als auch aus dem extravaskulären Gewebe wieder ins Blut einströmen¹, und dass die extravaskuläre Eiweissmenge beim Menschen² und Kaninchen³ einmal, bei der Ratte⁴ etwa dreimal so gross ist wie die im Blut zirkulierende Menge. Es wurde nun weiter geprüft, in welchen Organen und Geweben das Eiweiss in das extravaskuläre Gewebe übertritt, ob Unterschiede in der lokalen Kapillarpermeabilität bestehen, und wie gross die Menge an austauschbarem Eiweiss in den einzelnen Geweben ist.



J^{131} -Albumingehalt der Organe (nach Abzug der Restblutaktivität) in Abhängigkeit von der Zeit

Homologes, J^{131} -markiertes Serumalbumin wurde Ratten intravenös injiziert. Je 3 bzw. 4 Tiere wurden nach 20 min, 2, 6, 12, 24 bzw. 48 h getötet und die Organe *in situ* mit NaCl-Lösung durchspült. Je 1 g Organ (kleinere Organe nach Auffüllung des Gewichtes auf 1 g mit inaktiver Leber) wurde mit 2N NaOH bis zur Verflüssigung gekocht, neutralisiert, in Stahlschälchen getrocknet und die Radioaktivität mit dem Glockenzählrohr gemessen. Die Selbstabsorption der Gewebe sowie der Restblutgehalt der Organe, der in anderen Versuchen bestimmt worden war⁵, wurden berücksichtigt.

Albumin dringt in Leber, Milz und Lunge am schnellsten in das extravaskuläre Gewebe ein: Das Aktivitätsmaximum ist bereits 20 min *post injectionem* erreicht

¹ K. OEFF, Klin. Wschr. 32, 747 (1954).

² K. OEFF und P. KÖRTGE, Klin. Wschr. 34, 75 (1956).

³ K. OEFF, Z. exper. Med. 123, 434 (1954).

⁴ K. OEFF, Z. exper. Med. 123, 309 (1954).

⁵ K. OEFF und A. KÖNIG, Arch. exper. Path. Pharmacol. 226, 98 (1955).

(Abbildung). Nieren, Nebennieren, Darm und Gehirn haben die Höchstwerte nach 2 h, Herzmuskel, Magen und Speicheldrüse nach 6 h. Am langsamsten tritt das Albumin in Muskulatur, Hoden, Blase und schliesslich im Fettgewebe in das extravaskuläre Gewebe über.

Nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes laufen die Kurven der Organaktivitäten der Serumaktivitätskurve parallel. Lediglich in der Leber fällt das J^{131} -Albumin schneller ab als im Serum: es ist anzunehmen, dass dieser steilere Abfall auf die fortschreitende Verminderung der spezifischen Aktivität des Leber- J^{131} -Albumins durch neugebildetes, inaktives Albumin zurückzuführen ist.

Durch Extrapolation des einfach exponentiell verlaufenden Kurvenabschnittes auf die Ordinate kann nach folgendem Ansatz der Gehalt der einzelnen Organe an austauschbarem Albumin (Alb_x) ermittelt werden:

$$Alb_x = (A_x / A_2) \cdot Alb_s,$$

wobei A_x die Aktivität des betreffenden Organs bei $t = 0$, A_2 die Aktivität des Serums (nach Extrapolation) bei $t = 0$ und Alb_s die Serumkonzentration des (inaktiven) Albumins bedeuten.

Leber, Magen-Darmtrakt und Hoden enthalten viel austauschbares Albumin, das Gehirn relativ und – nach der Nebenniere – auch absolut am wenigsten (Tabelle). Am gesamten extravaskulären Verteilungsvolumen, das in diesen Versuchen das 2,8fache des Plasmavolumens betrug, hat die Muskulatur einen wesentlichen Anteil.

Gehalt der einzelnen Organe an austauschbarem Albumin

(Gesamt-muskulatur = 50% K.G., Gesamtfettgewebe = 10% K.G.)

	mg Albumin je Gesamt- organ	mg Albumin je g Organ
Blutserum	464,0	45,0
Leber	28,2	4,0
Magen		4,2
Dünndarm	21,0	1,5
Dickdarm		1,2
Hoden	17,5	4,4
Niere	6,5	4,9
Herz	4,2	4,9
Milz	2,3	2,1
Lunge	1,4	1,25
Gehirn	0,16	0,05
Nebenniere	0,12	1,9
Muskulatur	(415,0)	3,7
Fettgewebe	(40,5)	1,8

Die gleichen Organe, in denen nach unseren Ergebnissen Albumin verhältnismässig schnell aus dem Gefäßsystem austritt, geben auch viel Lymphe ab⁶. Die Menge an austauschbarem Albumin ist in einigen Organen dem von anderen Autoren⁷ gefundenen «Reserve-eiweiss» proportional. Die Beziehungen dieser Befunde

⁶ J. L. BOLLMAN, J. C. CAIN und J. H. GRINDLAY, J. Lab. clin. Med. 33, 1349 (1948). – M. FÖLDI, I. RUSZNYAK und G. SZABO, Acta med. Hungar. 4, 355 (1953).

⁷ S. C. MADDEN und G. H. WHIPPLE, Physiol. Rev. 20, 194 (1940).

zueinander werden ausführlich an anderer Stelle diskutiert⁸.

K. OEFF und A. KÖNIG

Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin,
den 22. Dezember 1955.

Summary

It was shown that the various organs and tissues differ from each other: (1) in the local capillary permeability for homologous I¹³¹-labeled serum albumin, and (2) in their contents of exchangeable albumin.

⁸ K. OEFF und A. KÖNIG, Z. exper. Med. (im Druck).

Tuberculostatic Activity of Some 4-Arylthiosemicarbazides and 4-Arylthiosemicarbazones

The discovery of tuberculostatic activity of thiosemicarbazones¹ suggested the desirability of investigating other closely related compounds in the hope that some pattern of structure-activity relationship might be found which would lead to compounds of the same or greater activity, but of a lower toxicity. After *p*-Acetamidobenzaldehyde thiosemicarbazone (Conteben) has been introduced as clinically effective tuberculostatic agent, some closely related thiosemicarbazones were made and tested (*inter alia*²). Among them, highest tuberculostatic activity was found to reside in a series of *p*-substituted benzaldehyde derivatives³ and this was confirmed also in our case. In light of these facts it

¹ R. BEHNISCH, F. MIETZSCH and H. SCHMIDT, Naturwissenschaften 33, 315 (1946); Angew. Chem. 60, 113 (1948); Amer. Rev. Tubercul. 61, 1 (1950). – G. DOMAGK, Amer. Rev. Tubercul. 61, 8 (1950).
² N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG, J. M. GAZAVE, L. SCHEMBRI, N. H. NAM, and C. T. LONG, Bull. Soc. chim. France 1956, 363. – R. DONOVICK, F. PANSY, G. STRYCKER, and J. BERNSTEIN, J. Bact. 59, 667 (1950). – D. HAMRE, J. BERNSTEIN, and R. DONOVICK, J. Bact. 59, 675 (1950). – H. H. FOX, J. org. Chem. 17, 555 (1952). – T. S. GARDNER, F. A. SMITH, E. WENIS, and J. LEE, J. org. Chem. 16, 1121 (1951). – E. HOGGARTH, A. R. MARTIN, N. E. STOREY, and E. H. P. YOUNG, Brit. J. Pharmacol. 4, 248 (1949). – A. R. MARTIN and G. T. STEWART, Brit. J. exper. Path. 31, 189 (1950).
³ J. P. JOVIN and N. P. BUU-HOI, Ann. Inst. Pasteur 72, 580 (1946).

was decided to prepare the related 4-Arylthiosemicarbazides and 4-Arylthiosemicarbazones and investigate their activity.

4-Arylthiosemicarbazides were synthesized by action of 50% aqueous hydrazine hydrate on an alcoholic solution of the corresponding isothiocyanates. 4-Arylthiosemicarbazones were synthesized by boiling the equimolar amounts of the aldehyde or ketone and the corresponding 4-Arylthiosemicarbazide in 96% ethanol for 5–10 min. For purification, the obtained derivatives were recrystallized from ethanol. Among many of these substances, that with the most pronounced tuberculostatic activity are listed in the Table.

The tuberculostatic activity was measured *in vitro* on the liquid culture medium Sula with the strain of *Mycobacterium tuberculosis* H 37Rv. As reference substance Solvoteben (diethylammonium salt of the thiosemicarbazone of Benzaldehyde-4-carboxylic acid) was used. The incubation temperature was 37°C and the incubation time was 14 days. The corresponding substances were dissolved in acetone to get the appropriate concentrations and added in the desired amounts to 5 ml of the culture medium.

It has been stated that thiosemicarbazones exert their antimicrobial action by forming copper chelates⁴ and this has been observed also with all above stated compounds which gave precipitates with a variety of metal ions.

It is interesting to find among these substances that some exhibit at least as great tuberculostatic activity as Conteben or Solvoteben and 4-Phenylthiosemicarbazide proved to be particularly effective *in vitro*.

Tests with other related compounds of this series are in progress.

Acknowledgement. The author is very much indebted to Dr. S. BANIČ of the Microbiological Institute of the Faculty of Medicine in Ljubljana for testing the compounds.

M. TIŠLER

Institut for Organic Chemistry, University Ljubljana,
March 9, 1956.

⁴ E. CARL and P. MARQUARDT, Z. Naturforsch. 4B, 280 (1949). – H. W. GAUSMAN, C. L. RHYKERD, H. R. HINDERLITER, E. S. SCOTT, and L. F. AUDRIETH, Bot. Gaz. 114, 292 (1953). – K. LIEBERMEISTER, Z. Naturforsch. 5B, 79 (1950).

Substance	Melting point (°C)	Formula	Analysis, % S		Minimum conc. for complete inhib. (γ/ml)
			found	calculated	
4-Phenylthiosemicarbazide	140	C ₇ H ₉ N ₃ S	19.25	19.17	0.1
4- <i>o</i> -Tolylthiosemicarbazide	147	C ₈ H ₁₁ N ₃ S	17.80	17.69	<5
4- <i>m</i> -Tolylthiosemicarbazide	110	C ₈ H ₁₁ N ₃ S	17.60	17.69	3
4- <i>p</i> -Tolylthiosemicarbazide	138	C ₈ H ₁₁ N ₃ S	17.72	17.69	5
Anisaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone	179	C ₁₅ H ₁₅ ON ₃ S	11.27	11.23	5
Vanillin-4-Phenylthiosemicarbazone	179–80	C ₁₅ H ₁₅ O ₂ N ₃ S	10.68	10.64	10
Cycloheptanone-4-Phenylthiosemicarbazone	96	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ S	12.26	12.27	10
<i>p</i> -Aminobenzaldehyde-4-Phenylthiosemicarbazone	188–9	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ S	11.66	11.86	5
<i>p</i> -Chloroacetophenone-4-Phenylthiosemicarbazone	180	C ₁₅ H ₁₄ N ₃ SCI	10.72	10.55	5
Piperonal-4-Phenylthiosemicarbazone	198	C ₁₅ H ₁₃ O ₂ N ₃ S	10.67	10.71	<10
Benzaldehyde-4-Phenylthiosemicarbazone	189	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ S	12.48	12.56	5
Furfuraldehyde-4-Phenylthiosemicarbazone	186–7	C ₁₂ H ₁₁ ON ₃ S	13.19	13.07	5
Cyclopentanone-4-Phenylthiosemicarbazone	152	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ S	13.60	13.74	<10
Cyclohexanone-4-Phenylthiosemicarbazone	111	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ S	12.78	12.96	10
Anisaldehyde-4- <i>p</i> -Tolylthiosemicarbazone	189–90	C ₁₆ H ₁₇ ON ₃ S	10.82	10.71	< 5
<i>p</i> -Aminobenzaldehyde-4- <i>p</i> -Tolylthiosemicarbazone	173	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ S	11.42	11.27	< 5
<i>p</i> -Chloroacetophenone-4- <i>p</i> -Tolylthiosemicarbazone	164–5	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ SCI	10.17	10.09	3
Furfuraldehyde-4- <i>p</i> -Tolylthiosemicarbazone	162	C ₁₃ H ₁₃ ON ₃ S	12.50	12.36	< 1

Zusammenfassung

Einige 4-Arylthiosemicarbazide und neue 4-Arylthiosemicarbazone wurden synthetisiert. Bei der Prüfung dieser Substanzen wurde eine beachtliche Hemmungswirkung gegenüber Tuberkelbazillen *in vitro* festgestellt.

Über die Steuerung des Ionengleichgewichtes zwischen Zellen und umgebender Flüssigkeit beim isolierten Froschherzen

Seit den Untersuchungen von RINGER ist bekannt, dass ein isoliertes Froschherz in isotonischer Lösung mit entsprechenden Konzentrationen von Na, K und Ca ausdauernd und gleichmässig funktioniert. In einer solchen Lösung kann vom isolierten Herzen das für die Funktion notwendige Ionengleichgewicht aufrechterhalten werden.

Werden der Flüssigkeit, mit der das Herz durchspült wird, ein oder mehrere Bestandteile entzogen, so nimmt die Herztätigkeit allmählich ab und schliesslich tritt ein Stillstand der Kammer ein. Weiter wissen wir, dass ein isoliertes Froschherz sich dem Fehlen einzelner Komponenten der Ringerlösung anzupassen vermag¹. In eigenen Versuchen haben wir die Adaptation an den Entzug von K, Ca und von beiden Ionen zusammen studiert.

Die Anpassung geht folgendermassen vor sich: Wird das Herz bis zum Kammerstillstand mit der unvollständigen Lösung gewaschen, dann ohne Durchspülung 1 ml im Herzen belassen, so stellt sich die spontane Tätigkeit wieder ein. (Abb. 1 zeigt die Verhältnisse für Ca-freie Lösung.)

Wir haben beweisen können, dass die Adaptation ausbleibt, wenn mit einer II.-Stannius-Ligatur Kammer und Vorhof voneinander getrennt und das Herz elektrisch gereizt wird.

Es ist möglich, die Kammertätigkeit mit verschiedenen Reizmethoden anzuregen. Die Reizung kann kontinuierlich oder in verschiedenen Perioden erfolgen; doch kehrt bei fehlender Spontanfunktion die Tätigkeit im unvollständigen Ionenmilieu in keinem Falle zurück. Mit normaler Ringerlösung kann dagegen das Ionengleichgewicht wieder hergestellt werden, worauf das Herz auch bei elektrischer Reizung von neuem zu schlagen beginnt (Abb. 2).

Die Tätigkeit des nach der I. Stannius-Ligatur spontan schlagenden Herzens stellt sich nach Aussetzen der Durchspülung mit unvollständiger Ringerlösung wieder ein. In geringerem Masse besteht diese Adaptation auch bei einem Herz, das nach der Ligatur spontan nicht mehr pulsiert.

Unsere Versuche zeigen, dass der Vorhof, von dem die auslösenden Reize für die Kontraktionen ausgehen, daneben auch das für die Funktion notwendige Ionengleichgewicht zwischen isoliertem Herz und Umgebung aufrechterhält, dass er also den Stoffwechsel des Herzens weitgehend reguliert.

Aus der Analyse des Mechanismus der Adaptation an Lösungen ungünstiger Ionenzusammensetzung ergibt

sich die Folgerung, dass einerseits in der Flüssigkeit, in der die Herztätigkeit erst geschwächt, dann normalisiert wird, andererseits aber auch im Stoffwechsel des Herzens selber Änderungen eintreten müssen.

Ältere Autoren (BOEHM, ARIMA) haben gezeigt, dass fehlende Ionen vom Herzen an die umgebende Flüssigkeit abgegeben werden. Nach unseren Versuchsergebnissen kann diese Erscheinung allein die Rückkehr der Funktion nicht erklären. Abbildung 3 zeigt, dass bei Ca-Mangel die Adaptation nicht darauf beruht, dass ein positiv inotroper Stoff (zum Beispiel Ca) in ausreichender Menge in die Flüssigkeit gelangt. Wenn die Lösung, in welcher das Herz von neuem andauernd und kräftig schlägt, entfernt und das Organ zweimal mit Ca-freier Lösung gewaschen wird, vermindert sich die Tätigkeit wieder. Auch Durchspülung des Herzens mit jener Flüssigkeit, in welcher die Reaktivierung erfolgte, vermag die Funktion nicht zu verbessern. Weiter ist aus Abbildung 3 zu ersehen, wie bei der Wiederherstellung der Aktivität die umgebende Lösung sich so verändert, dass ein neues Ionengleichgewicht aufrechterhalten wird. Wäre dem nicht so, würde die Funktion bei Zugabe neuer Lösung nicht sofort abgeschwächt. Diese Änderung ist jedoch bloss einer der Faktoren, die zur Erhaltung des neuen Ionengleichgewichtes beitragen. Bei fehlendem K oder K und Ca sind die Verhältnisse dieselben.

Weiter haben wir gesehen, dass ein isoliertes, spontan funktionierendes Froschherz sich nicht nur an das Fehlen, sondern auch an ein Übergewicht von Ionen adaptiert. Diese Anpassung fehlt völlig bei der nach II.-Stannius-Ligatur spontan nicht mehr schlagenden Kammer. Die grosse Adaptationsfähigkeit des Herzens an Schwankungen des K-Gehaltes der Lösung verdient besondere Beachtung. Wird der extrazelluläre K-Spiegel auf das 10–20fache erhöht, so hören die Kontraktionen der Kammer sofort auf. Doch kehrt die spontane Funktion binnen 1–24 h nach Aussetzen der Durchspülungen trotz des riesigen K-Übergewichtes wieder zurück.

Der feinere Mechanismus der Vorgänge, die bei einzeitigem oder gleichzeitigem Entzug von K und Ca die Wiederherstellung der Funktion, die Stoffwechseländerung und die aktive Steuerung des neuen Ionengleichgewichtes ermöglichen, ist einstweilen unbekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Kammerstoffwechsel des spontan funktionierenden, isolierten Froschherzens grundsätzlich verschieden ist vom Stoffwechsel des spontan nichttätigen Froschventrikels. Auf diesen Unterschied weisen auch jene Versuche hin, die ergaben, dass einige positiv inotrope Substanzen (zum Beispiel ATP) an der nach II.-Stannius-Ligatur elektrisch gereizten Froschherzkammer unwirksam sind.

Ausführliche Daten über die Erhaltung und aktive Steuerung des Ionengleichgewichtes zwischen dem isolierten Froschherzen und der umgebenden Flüssigkeit werden in Acta Physiologica Hungarica mitgeteilt.

J. KNOLL

Pharmakologisches Institut der medizinischen Universität Budapest, den 7. Februar 1956.

Summary

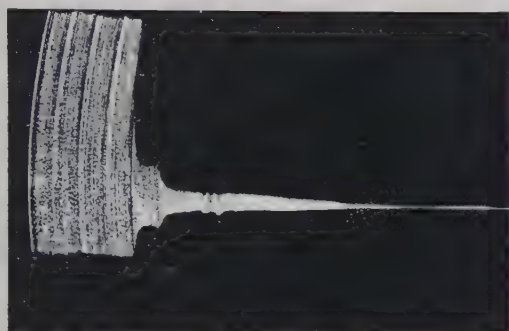
(1) The isolated frog's heart, repeatedly washed with Ca-free Ringer's solution, stops and, after discontinuing washing, begins to move again in spite of Ca lack. The heart adapts in the same way to the common lack of Ca

¹ R. BOEHM, Arch. exper. Path. Pharm. 75, 230 (1914). – R. ARIMA, Pflügers Arch. 157, 531 (1914).



↑
1

Abb. 1. Spontan funktionierendes isoliertes Froschherz in normaler Ringerlösung. Bei 1 wurde der Kanüleninhalt 30 min lang jede Minute mit 1 ml 0,65% NaCl + 0,0075% KCl enthaltender Lösung ausgetauscht. Beim Unterbruch der Kurve ist ein Abschnitt mit stillstehender Kammer herausgeschnitten worden. Die Kammer begann spontan nach 30 min wieder zu funktionieren und erreichte das in der Abbildung sichtbare Maximum nach $2\frac{1}{2}$ h.



↑
1



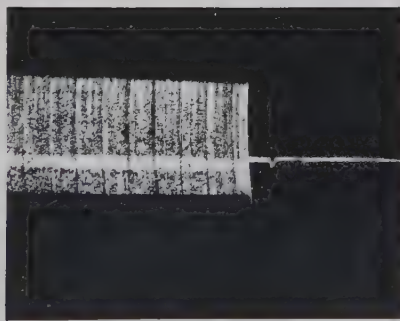
↑
2

↑
3

Abb. 2. Nach der II.-Stannius-Ligatur mit elektrischer Reizung funktionierende Froschherzkammer in normaler Ringerlösung. Bei 1 wurde das Herz während 23 min jede min mit 0,65% NaCl und 0,0075% KCl enthaltender Lösung durchspült. Eine 8 h lange Registrierung mit trotz kontinuierlicher elektrischer Reizung stillstehender Kammer ist an der Unterbrechungsstelle der Kurve herausgeschnitten worden. Bei 2 wurde 0,1 ml normale Ringerlösung zugegeben. Bei 3 wurde der Kanüleninhalt entleert und mit normaler Ringerlösung ausgetauscht.

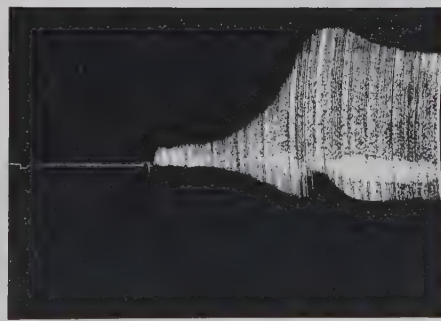


↑
1



↑
2

↑
3



↑
4

↑
5

Abb. 3. Spontan funktionierendes Froschherz in normaler Ringerlösung. Bei 1 wurde das Herz mit 0,65%-NaCl- und 0,0075%-KCl-haltiger Lösung dreimal durchspült. Nachher erfolgte spontane Wiederherstellung der Tätigkeit, die das Maximum nach 1 h 50 min erreichte. Bei 2 wurde die Flüssigkeit, in der das Herz kräftig arbeitet (F-Flüssigkeit) entleert und in die Kanüle wieder 0,65% NaCl + 0,0075% KCl enthaltende Lösung gebracht. Nach zweimaligem Durchspülen wurde bei 3 die F-Flüssigkeit wieder in die Kanüle eingefüllt. Nach 30 min wurde bei 4 mit Ca-freier Lösung und bei 5 15 μgCa^{++} zugesetzt.

and K, furthermore to Ringer's solution containing 10–20 times more K than normal.

(2) Adaptation was not observed on isolated ventricle driven with electrical current.

(3) It is concluded that the isolated frog's heart adapts to the ion composition of the surrounding fluid as a whole, and that the auricle plays an essential role in this process.

Hydrogen Peroxide and Heinz Bodies

The idea that haemoglobin was protected by the blood cell catalase against the destructive effect of hydrogen peroxyde produced during cell metabolism was suggested by BINGOLD¹. This role of catalase has since been confirmed by several authors². It is claimed also by some authors that there is a protective action of catalase against Heinz body formation³. The causal relationship between catalase inhibition and Heinz body formation has not been proved up to now. It is even questionable whether peroxyde can produce Heinz bodies. The aim of this study was to elucidate this problem.

Venous blood of healthy male blood donors was used in the course of our experiments. Blood coagulation was prevented by dried citrate. Experimental methods as follows:

¹ K. BINGOLD, *Klin. Wschr.* 12, 1201 (1933).

² G. BARKAN and O. SCHALES, *Z. physiol. Chem.* 253, 83 (1938). – R. LEMBERG, J. W. LEGGE, and H. W. LOCKWOOD, *Nature* 142, 148 (1938).

³ S. BRENNER and A. C. ALLISON, *Exper.* 9, 381 (1953). – E. SCHÜTZ, Inaug.-Dissertation Würzburg, 1954. – W. KÜNZER, E. AMBS, and D. SCHNEIDER, *Z. Kinderheilk.* 74, 652 (1954).

To 1.0 ml of blood similar amount of potassium cyanide (1%, 0.5%, 0.1% or 0.05%) and after 5 min 1.0 ml of 1% hydrogen peroxyde was added. Hydrogen peroxyde was dissolved in *M*/15 phosphate buffer of pH 7.0. Solutions of lower concentrations prepared from 1% potassium cyanide were diluted with the same buffer solution.

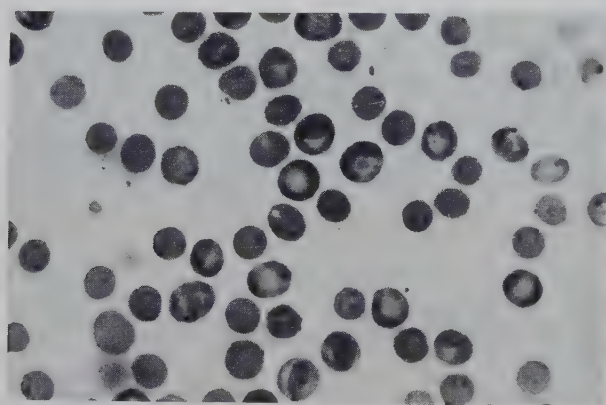
Samples taken at different periods were stained by the Wolfer staining technique with methyl violet⁴. It is well known that potassium cyanide, inspite of being 'an effective catalase poison'⁵, does not produce Heinz bodies⁶. Probably this is due—if the catalase inhibition theory of Heinz body production is assumed—to the fact that cyanide also inhibits the genesis of peroxyde.

In course of our experiments, we were able to state that exogenous peroxyde produces Heinz bodies in the cyanide affected red blood cells kept at appropriate temperature. The onset of Heinz body formation as well as their number and size depends on temperature and on the concentration of cyanide.

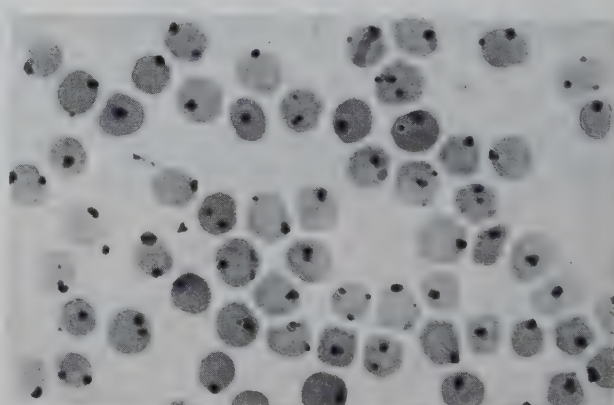
⁴ *Planches d'Hématologie Sandoz* (Basle 1950).

⁵ P. RONA, A. FIEGEL, and Y. NAKAHARA, *Biochem. Z.* 160, 273 (1925).

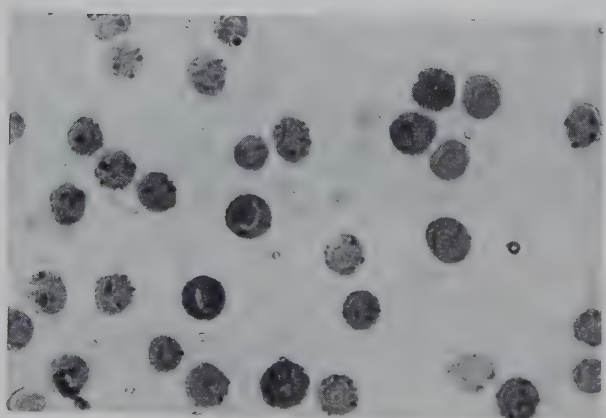
⁶ O. WALLER, *Folia haematol.* 73, 159 (1955).



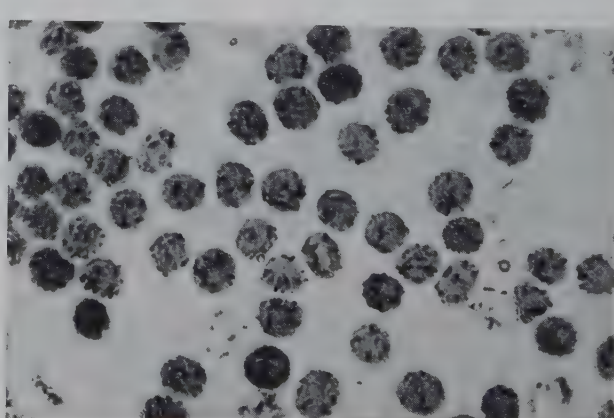
a after adding H_2O_2 at room temperature in the 20th min



b after adding H_2O_2 at room temperature in the 90th min



c after adding H_2O_2 at 37°C water bath in the 10th min



d after adding H_2O_2 at 37°C water bath in the 45th min

Heinz bodies in potassium cyanide poisoned red blood cells after treatment with hydrogen peroxide. 1.0 ml 1% KCN and 1.0 ml 1% H_2O_2 is added to 1.0 ml blood.

At room temperature, 1–3 small Heinz bodies appear in the red blood cells treated with potassium cyanide solutions of 1% and 0.5% in the 15–25th min. In the 40th min, the size of Heinz bodies increases but in most cells only 1–1 of them can be observed. These large Heinz bodies are seemingly formed by visible aggregation of several. A further growth is to be seen in the 90th min. The Heinz bodies observed in these experiments correspond morphologically to those produced *in vivo* on effect of aniline. At lower cyanide concentration (0.1% and 0.05%) there are no Heinz bodies in the 20th and only 1–2 very small ones occur in the 40th min. In the 90th min no difference in size was found, but in certain red blood cells 2 or even 3 Heinz bodies were observed.

The Heinz bodies appear at 37°C in the red blood cells exposed to the two higher concentrations of cyanide till the 5th min, whereas at lower concentration in the 5–10th min. Their number is higher than at room temperature. The disposition to aggregation is also seen at the two higher concentrations. This effect is lacking at lower concentration, however Heinz body production which is low at the beginning becomes very intensive after the 30th min, although the Heinz bodies produced keep their small character.

No Heinz body formation is observed in test tubes kept on melting ice. The close dependence on temperature suggests that peroxyde acts not directly but only initiates chemical processes leading to Heinz body formation. The role of cyanide cannot be limited to the catalase inhibition, as it is sufficient in 0.05% concentration to the total inhibition, whereas 1.0 ml of 1% potassium cyanide is sufficient to exclude practically catalase activity during 60 min⁵. However in experiments with the two higher concentrations, Heinz body formation begins after a shorter latent period and is more intensive. From this fact, it can be concluded that, similarly to the production of verdoglobine CN (pseudohemoglobine)⁷ in the chemical processes initiated by peroxyde, the catalase inhibiting substance plays a direct role. This is in accord with the verdoglobine A (choleglobine)⁸ or Heinz body⁹ production power of ascorbic acid. In these processes, ascorbic acid is not only needed as peroxyde-producing substance but also—similarly to cyanide—to achieve an adequate effect.

L. MAGOS

State Institute for Labour Hygiene, Budapest (Hungary),
April 17, 1956.

Zusammenfassung

In den mit Cyanid vergifteten Erythrozyten produziert das exogene H₂O₂ bei geeigneter Temperatur Heinzsche Körperchen. Die Bildung der Heinzschen Körperchen, ihre Anzahl und Grösse ist von Temperatur und Cyanid-Konzentration abhängig.

Il tenore di acido desossiribonucleico negli eritrociti di *Anas platyrhynchos*, *Cairina moschata* e dei loro ibridi diretti e reciproci*

Le ricerche quantitative sul comportamento del contenuto in acido desossiribonucleico negli ibridi appaiono di notevole interesse perchè non sempre esso è corrispondente nelle specie parentali e si pone il problema della sua distribuzione e stabilizzazione nel prodotto del loro accoppiamento, onde ottenere nuclei più o meno perfettamente equilibrati da un punto di vista funzionale, ottenendosi talora persino cellule germinali con potenzialità generativa.

Il presente lavoro fa seguito ad uno analogo compiuto da VIALLI e da me¹ sull'asino, il cavallo ed il mulo; si inquadra inoltre nella linea di ricerca prospettata da VIALLI² per l'istochimica comparativa dell'acido desossiribonucleico, che si presenta ricca di sviluppi per le connessioni con problemi di fisiologia e biologia nucleari. In particolare gli ibridi oggetto di questo studio rivestono maggiore interesse per essere intergenerici e non solo interspecifici (come il mulo).

Ho utilizzato per tale indagine strisci di sangue periferico di due esemplari di *Anas platyrhynchos* (un maschio ed una femmina), due di *Cairina moschata* (un maschio ed una femmina), tre di *Anas* × *Cairina* (un maschio e due femmine) e due di *Cairina* × *Anas* (due maschi): nominando tagli ibridi nel corso del lavoro è sempre indicata per prima la specie paterna.

Dopo aver praticato la reazione di FEULGEN su tutti i preparati (due per ciascun esemplare) in un unico blocco, ho eseguito le misurazioni fotometriche sui nuclei degli eritrociti (25 per ciascun striscio). A tale scopo ho utilizzato il modello di istofotometro di VIALLI³, ponendovi un diaframma fisso, la cui apertura corrispondeva, con l'ingrandimento da me usato (ob. 97 ×, oc. 16 ×) a 0,90 µ di diametro nel preparato; con esso veniva misurata una porzione dell'area nucleare variabile dal 12% al 5% circa. La misurazione a diaframma fisso, trattandosi di nuclei fortemente allungati, è risultata la più comoda e la più utile, come ho potuto accertare in una indagine, eseguita in collaborazione con MENEGHETTI GENNARO⁴ sui criteri di misurazione ottimali per la istofotometria in condizioni diverse di grandezza e di forma dei nuclei. L'elaborazione delle misurazioni, onde ottenere i valori di contenuto relativo in acido desossiribonucleico per nucleo, è stata descritta nel già citato lavoro, pure sugli ibridi, di VIALLI e GERZELI¹.

Nella Figura sono gli istogrammi comprensivi di tutti i dati ricavati per striscio, per esemplare e per animale; a fianco sono esposti i valori medi di contenuto in acido desossiribonucleico per nucleo, in unità arbitrarie, con indicazione delle corrispondenti deviazioni standard.

Un primo esame di questi valori dimostra, oltre ad una discreta differenza dei valori medi nei diversi animali, una estensione della curva di distribuzione dell'acido desossiribonucleico decisamente maggiore negli ibridi e precisamente negli esemplari di sesso maschile, rispetto

⁷ G. BARKAN and O. SCHALES, Z. physiol. Chem. 253, 83 (1938).

⁸ R. LEMBERG, J. W. LEGGE, and H. W. LOCKWOOD, Nature 142, 148 (1938).

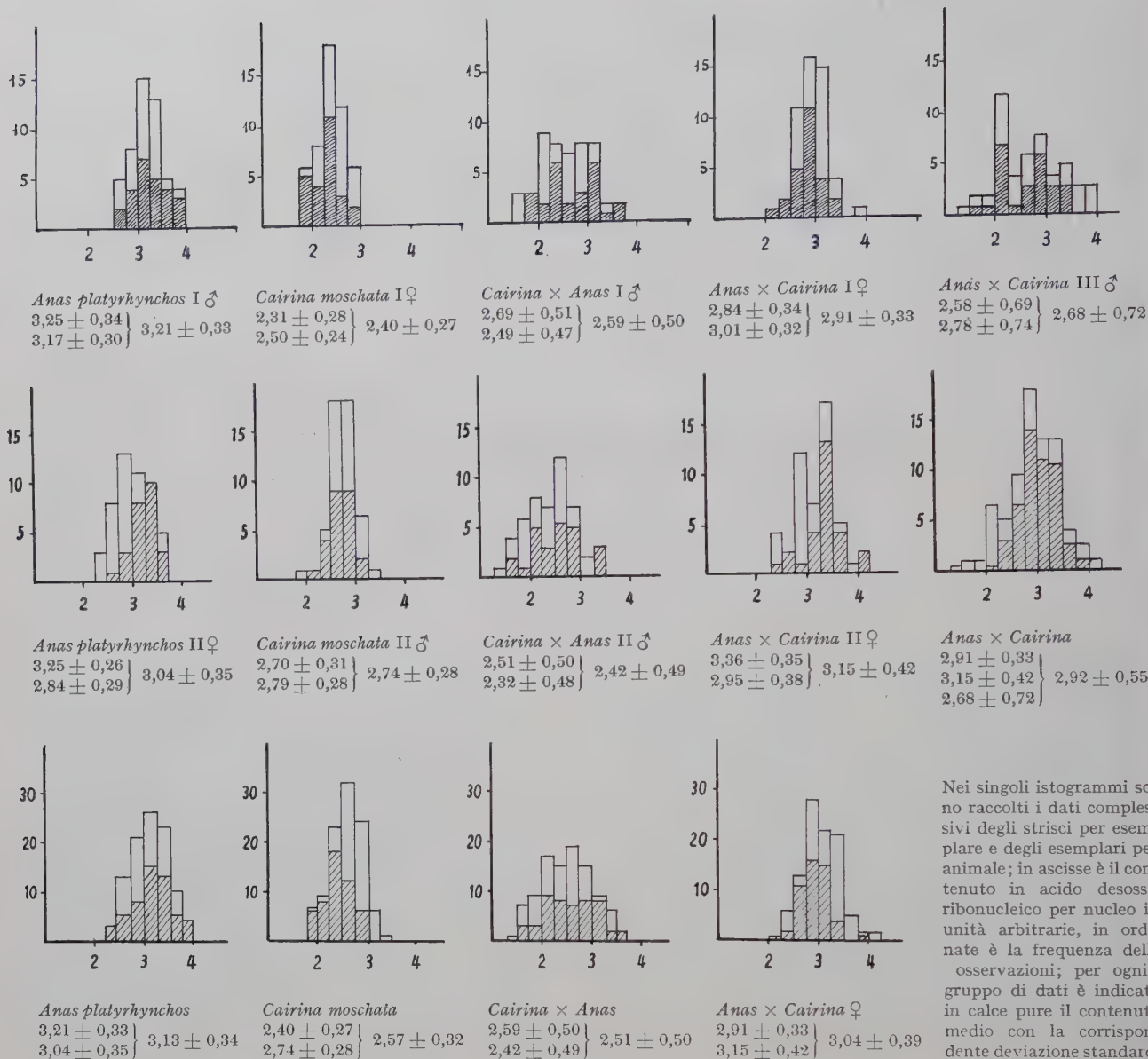
⁹ A. GAJDOS and G. TIPREZ, C. r. Soc. biol. 139, 545 (1945).

* Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R. Il materiale è stato raccolto alla Stazione Sperimentale di Pollicultura di Rovigo, diretta dal prof. A. TAIBEL, al quale devo i più vivi ringraziamenti, anche per le utili indicazioni ed i consigli forniti.

¹ M. VIALLI e G. GERZELI, Rend. Ist. Lomb. Sci. Lett. 88, 273 (1955).
² M. VIALLI, Boll. Zool. 21, 153 (1954); Monit. zool. Ital. 62, 28 (1954).

³ M. VIALLI e S. PERUGINI, Riv. Istochim. norm. pat. 1, 149 (1954).

⁴ G. GERZELI e A. MENEGHETTI GENNARO Anat. Anz. 1956 (in stampa).



Nei singoli istogrammi sono raccolti i dati complessivi degli strisci per esemplare e degli esemplari per animale; in ascisse è il contenuto in acido desossiribonucleico per nucleo in unità arbitrarie, in ordinate è la frequenza delle osservazioni; per ogni gruppo di dati è indicato in calce pure il contenuto medio con la corrispondente deviazione standard.

alle specie parentali; inoltre gli istogrammi indicano una tendenza alla bimodalità nelle distribuzioni dei valori negli stessi ibridi di sesso maschile.

Questa diversità nelle variabilità dei dati per i singoli gruppi (rivelata da una inomogeneità delle varianze, secondo il test di BARTLETT) non permette un'analisi complessiva della varianza⁵: ho cercato comunque quali di queste varianze fossero differenti fra loro per mezzo della *F* di SNEDECOR ed infine ho studiato tutti i singoli confronti fra medie logicamente interessanti (raggruppando inoltre i dati comunque ottenuti per esemplare e per animale), analizzando le differenze per mezzo del *t* di STUDENT (con la necessaria correzione del *t* tabulare nel caso di differenze significative fra le varianze).

Sono risultate differenze significative ad un livello elevato ($P < 0,001$) fra le varianze delle specie parentali rispetto agli ibridi maschi, fra i due ibridi reciproci e fra gli esemplari dei due sessi in *Anas* × *Cairina*.

Fra le medie sono apparse differenze significative ad un livello probativo:

- 1) nei preparati di *Anas platyrhynchos* II ♀ ($P < 0,001$), di *Cairina moschata* I ♀ ($P < 0,01$) e di *Anas* × *Cairina* ($P < 0,001$);
- 2) negli esemplari di *Cairina moschata* ($P < 0,001$) e *Anas* × *Cairina* ($P < 0,01$);
- 3) in *Anas* rispetto a *Cairina* ($P < 0,001$), *Anas* × *Cairina* ♂ ($P < 0,001$), *Anas* × *Cairina* ($P < 0,01$) e *Cairina* × *Anas* ($P < 0,001$); in *Cairina* rispetto ad *Anas* × *Cairina* ♀ ($P < 0,001$) e *Anas* × *Cairina* ($P < 0,001$); in *Cairina* × *Anas* rispetto ad *Anas* × *Cairina* ♀ ($P < 0,001$) e *Anas* × *Cairina* ($P < 0,001$).

Si può ritenere che le differenze riscontrate fra alcuni strisci di uno stesso individuo e fra gli esemplari di *Cairina moschata* siano dovuti a fattori tecnici e non biologicamente rilevanti (ammessa la costanza del tenore in acido desossiribonucleico per nuclei interfascici non più moltiplicantisi di organi corrispondenti in condizioni funzionali simili). Sono invece da prendere in particolare

⁵ C. H. GOULDEN, *Methods of Statistical Analysis* (Wiley & Sons, New York 1952).

esame le altre differenze che appaiono indipendentemente dalle predenti (e direi nonostante queste) fra varianze e fra medie nei diversi esemplari di *Anas* × *Cairina* e nei vari animali.

Nel complesso le due specie parentali si sono rivelate nettamente differenti per tenore medio in acido desossiribonucleico (è maggiore di circa il 20% in *Anas platyrhynchos*).

Negli ibridi la variabilità dei singoli dati è stata più elevata, ma solo negli esemplari di sesso maschile, di quella nelle specie parentali; la tendenza alla bimodalità osservabile negli istogrammi può indicare la possibile presenza di due popolazioni di valori in ogni individuo.

Il tenore medio dell'ibrido *Cairina* × *Anas*, per cui disponevo solo di due esemplari maschi, è stato corrispondente a quello della specie paterna, che presentava i valori più bassi.

L'ibrido reciproco ha mantenuto nel complesso un valore intermedio fra quelli delle specie parentali; però con una notevole differenza fra gli esemplari dei due sessi: mentre quello di sesso maschile ha presentato un valore medio uguale a quello dell'ibrido reciproco, nonché a quello della specie materna (con i valori minori), i due esemplari di sesso femminile hanno fornito un valore corrispondente a quello della specie paterna (con i valori maggiori).

È suggestiva la corrispondenza fra queste osservazioni (medie di valori e loro distribuzione) e la constatazione della profonda sterilità dei maschi di entrambi gli ibridi, mentre le femmine studiate erano giunte a deporre uova, indicando un maggior equilibrio dei loro gameti, confermato da una più regolare distribuzione dell'acido desossiribonucleico per nucleo.

Questi dati si prestano ad un confronto interessante con quelli già pubblicati riguardanti l'asino, il cavallo ed il mulo¹: quest'ultimo presentava, indipendentemente dal sesso, un tenore intermedio fra quelli delle specie parentali; non erano presenti inoltre le irregolarità nella distribuzione dei singoli dati, riscontrate in questi ibridi di anitra, particolarmente nei maschi.

Si tratta di risultati che invitano ad una estrema prudenza, già in precedenza espressa¹, prima di giungere a conclusioni generali: ulteriori chiarimenti sono da attendersi da un'estensione delle ricerche ad altri ibridi, prendendo in esame anche le cellule germinali oltre che le somatiche e, nel caso di fertilità, anche solo relativa, pure i prodotti della seconda generazione e dei reincroci ottenibili.

Per quanto compiute in campo diverso meritano un cenno, perchè si allacciano a tali questioni, le osservazioni di LEUCHTENBERGER e coll.⁶ che in spermatozoi umani notarono caratteristiche alterazioni della distribuzione e del contenuto medio in acido desossiribonucleico, in rapporto ad alterazioni delle capacità riproduttive.

È di un certo interesse infine confrontare questi dati istofotometrici con i caratteri cromosomici; in MATTHEY⁷ ed in WHITE⁸ sono raccolte e valutate criticamente diverse osservazioni sulle specie qui esaminate ed i loro ibridi. Si nota come non vi sia accordo completo sul numero complessivo dei cromosomi e sui caratteri degli eterocromosomi: comunque le due specie parentali differirebbero di pochissimo e così pure l'ibrido. Al con-

trario il contenuto in acido desossiribonucleico si presenta notevolmente diverso, ciò che indicherebbe una indipendenza di questo valore dal numero dei cromosomi. Non è possibile per ora accertare la ragione di questa diversa carica in acido desossiribonucleico per cromosoma, in specie con cromosomi morfologicamente così simili.

G. GERZELI⁹

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia, il 7 marzo 1956.

Summary

The desoxyribonucleic acid content in nuclei of erythrocytes in *Anas platyrhynchos*, *Cairina moschata* and their direct and reciprocal hybrids is studied by the quantitative method. A significant difference was found between the amounts in the two parental species. The hybrids reveal an irregularity in behaviour of their means and distribution of contents. This seems to be dependent on their origin and sex. These findings are discussed and critically compared with other data from the literature, concerning the desoxiribonucleic acid content and chromosome-characteristics.

⁹ Borsista del C.N.R.

Relationship Between Passive Hemagglutination of Tanned Red Cells Coated with Fraction I and Fibrinolysis in Cirrhosis of the Liver

The BOYDEN method¹ has been applied by KISSMEYER-NIELSEN² to the fixation of platelet extract on the surface of red cells and to the study of rabbit antibodies against human thrombocytes. SAUER and VAN LOGHEM³, KISSMEYER-NIELSEN⁴, DAUSSET, BERGEROT-BLONDEL and BREC⁵ used this method for the study of hemorrhagic syndromes in human subjects. It has been shown by DUCOS⁶ and confirmed by us, that the platelet extract can be replaced by fibrinogen.

It appears to us that this reaction was frequently strong in severe cases of cirrhosis of the liver associated or not with a hemorrhagic syndrome but always accompanied by moderate thrombocytopenia. In studying this reaction, we noted that it was: (1) negative when the serum was obtained immediately after clotting by the use of mechanical agitation with glass beads, and (2) strongly positive when the serum was separated from the clot after an incubation period of 1 to 2 h at 37°C.

These facts led to the investigation of the role of the clot in this reaction. We made a cross experiment of clots the results of which are given in the Table I. As can be seen, the reaction is positive only, when the patient's clot was incubated in pathological as well as in normal sera, or even in physiological saline. *During the incubation the patient's clot liberates a substance capable to react with*

¹ S. V. BOYDEN, J. exper. Med. **93**, 107 (1951).

² F. KISSMEYER-NIELSEN, Vox Sanguinis **3**, 123 (1953).

³ A. J. SAUER and J. J. VAN LOGHEM, Vox Sanguinis **4**, 120 (1954).

⁴ F. KISSMEYER-NIELSEN, Sang **26**, 117, 123 (1955).

⁵ J. DAUSSET, Y. BERGEROT-BLONDEL, and H. BREC, Sang **9**, 861 (1955).

⁶ J. DUCOS, National Congress of Blood Transfusion, Bordeaux (1956).

⁶ C. LEUCHTENBERGER, F. SCHRADER, D. R. WEIR e D. P. GEN-
TILE, Chromosoma **6**, 61 (1953).

⁷ R. MATTHEY, Les Chromosomes des Vertébrés (Librairie de l'Uni-
versité, Lausanne 1949).

⁸ M. J. D. WHITE, Animal Cytology and Evolution (University
Press, Cambridge 1954).

Passive Hemagglutination

Mixture of a pathological blood (cirrhosis of the liver) with a normal blood:

Pathological serum* incubated during 2 h at 37°C in contact with:

Pathological red cells	—
Normal red cells	—
Pathological platelets	—
Normal platelets	—
Clot of the pathological plasma (without anticoagulant)	+ + ¹ / ₄
Clot of the normal plasma (without anticoagulant)	—
Without any contact	—

Physiological saline incubated during 2 h at 37°C in contact with:

Pathological clot	+ + ¹ / ₁₆
-----------------------------	----------------------------------

Normal serum* incubated during 2 h at 37°C in contact with:

Normal red cells	—
Pathological red cells	—
Normal platelets	—
Pathological platelets	—
Clot of the normal plasma (without anticoagulant)	—
Clot of the pathological plasma (without anticoagulant)	+ + ¹ / ₂
Without any contact	—

Physiological saline incubated during 2 h at 37°C in contact with:

Normal clot	—
-----------------------	---

* Sera immediately separated after clotting by the use of mechanical agitation with glass beads, incubated at 37°C with and without contact, and then heated, at 56°C for 30 min. All reactions are negative without heating at 56°C.

fraction I coating the tanned red cells. This substance agglutinates these red cells only when it has been heated previously for 30 min at 56°C.

The immunological nature of this substance is doubtful. Experiments have shown at least two different kinds of behavior in relation to rabbit antibodies against human platelets: (1) the rabbit antibody is formed in the serum and is not liberated by the incubated clot; (2) it does not require heating at 56°C to promote hemagglutination.

The relation between hemagglutination and fibrinolysis has been demonstrated by two different approaches:

(a) Clots of patients, in which the reaction was found strongly positive, have marked tendency to fibrinolysis. This was seen after incubation of blood, diluted with equal volume of physiological saline, at pH 7.2, under sterile conditions, during 24 h at 37°C. In all cases complete lysis has been observed.

(b) 1 cm³ of normal blood, clotted at 37°C in the presence of 15 mg of purified bovine fibrinolysin, gives off, after 2 h of incubation at 37°C, a serum capable also to promote the reaction. Complete lysis of the clot is observed after 24 h under the same conditions.

Conclusions. In the course of fibrinolysis of the clot, which is an especially rapid process in liver cirrhosis, this clot liberates a substance which is capable, after heating of 30 min at 56°C, to react with tanned erythrocytes coated with a plasmatic substance found in fraction I. It is probable that this phenomenon is not limited to liver cirrhosis, but can be found also in other syndromes associated with fibrinolysis. It is believed this is an exacerbation of a normal physiological process.

We wish to thank Drs. E. C. LOOMIS of Detroit and J. P. SOULIER of Paris for the preparations of bovine fibrinolysin and for their advice.

J. DAUSSET, Y. BERGEROT-BLONDEL,
and A. PARAF

National Centre of Blood Transfusion, Paris, March 15, 1956.

Résumé

Au cours de la fibrinolyse, particulièrement précoce au cours des cirrhoses du foie, le caillot libère une substance capable après chauffage de 30 min à 56°C de réagir avec

des hématies recouvertes d'une substance plasmaticque présente dans la fraction I.

Il est probable que le phénomène n'est pas limité aux seules cirrhoses hépatiques, mais s'étend à d'autres syndromes hémorragiques (fibrinolytiques) et qu'il s'agirait de l'exagération d'un processus physiologique normal.

A Dialyzable Factor from Plasma Responsible for the "Viscous Metamorphosis" of the Blood Platelets. Its Role in Clot Retraction and Haemostasis*

During coagulation of normal blood, the thrombocytes undergo a series of morphological changes which lead finally to their total disintegration. This phenomenon is generally called "viscous metamorphosis" of the platelets, and its most easily observed manifestation consists in agglutination and clumping of these cells. Since it is known that in most cases thrombus formation in venous thrombosis starts out from agglutinated and fused platelets adhering to the wall of a blood vessel, attention in recent years has been focused on the factors involved in the thrombocyte agglutination¹. A new dialyzable factor was discovered in the course of the following experiments.

Some authors still believe *clumping* of the thrombocytes to be a secondary phenomenon due to the conversion of small amounts of fibrinogen to fibrin or pro-fibrin², in spite of the fact that platelets in afibrinogenemic plasma agglutinate normally³, and that elec-

* Supported by grants from the Swiss National Foundation for Scientific Research and the F. Hoffmann-La Roche Foundation.

¹ Throughout this paper agglutination is understood in the sense of describing the first manifestation of viscous metamorphosis, thus excluding nonspecific aggregation or serological reaction of intact cells with antiplatelet antibodies.

² K. APITZ, *Erg. inn. Med.* 61, 54 (1942). — K. LENGGENHAGER, *Weitere Fortschritte in der Blutgerinnungslehre* (Georg Thieme, Stuttgart, 1949), p. 7 and 177.

³ B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN, L. RICH, A. G. LE BOLLOCH, L. K. DIAMOND, and W. BORGES, *Blood* 9, 843 (1954).

tron microscopy⁴ and staining methods disprove the presence of fibrin in the agglutinates. We have been able to show⁵ that a "serum" rich in prothrombin obtained by recalcification from a platelet-free plasma and containing no detectable amounts of fibrinogen agglutinates added thrombocytes completely in a few minutes. On the other hand, normal serum obtained from spontaneously clotted fresh blood has lost this platelet-destroying property; this suggests that one of the responsible factors is consumed during clotting in the presence of platelets. Serum from patients with haemophilia A or haemophilia B, lacking antihæmophilic factor or Christmas factor, respectively, proved fully active in our agglutination test⁶. This disproves the explanation offered by BERGSAGEL⁷ that the combination of Christmas factor, antihæmophilic globulin and calcium is responsible for platelet agglutination. The pathological sera with pronounced platelet-destroying activity, i.e. from cases of haemophilia A and B and of thrombopenia, and the serum from platelet-free plasma have one property in common, this being their high contents of prothrombin. Our work seemed therefore in agreement with the observations by WRIGHT and MINOT⁸ who found as early as 1917 that "serozyme" can cause viscous metamorphosis of the platelets. However, in our experiments incubation of washed platelets with prothrombin and calcium did not cause agglutination of the cells. (Platelets were obtained by centrifugation from citrated bovine blood, washing 5 times in NaCl-citrate solution, and suspending in physiological saline). The same negative result was found with tissue thromboplastin, Ca, and prothrombin, or when an equivalent amount of thrombin was added to washed platelets. Purified preparations of prothrombin or thrombin alone are therefore not responsible for platelet agglutination; presence or absence of a wettable surface is thereby without influence.

According to our concept of *clot-retraction*, material in the platelets—and in no case fibrin—is the retractile substance, the fibrin playing the completely passive role of being drawn together by the retracting "pseudopodia"-material of the thrombocytes. Sending out of pseudopodia by the platelets is considered to be the first sign of viscous metamorphosis, and therefore the ability of a thrombocyte-containing fibrin clot to retract was taken as a criterion for the presence of a system capable of producing viscous metamorphosis of the platelets in the fibrin network.

Such minimum systems for clot-retraction have been described by several authors. BUDTZ-OLSEN⁹ found that in a system of fibrinogen, prothrombin, CaCl₂ and platelets retraction occurs; according to ELLICOTT and CONLEY¹⁰ thrombin, fibrinogen, platelets and serum albumin are another example for such a minimum system. Working with the retraction test described by FONIO¹¹, and with material of bovine origin, we found that neither

system led to retractile clots as long as the components used were pure enough. (Fibrinogen was prepared according to WARE, GUEST, and SEEGER¹²; prothrombin was adsorbed on BaSO₄ and reprecipitated after elution. Acetone-precipitated lung thromboplastin, *Armour* cryst. bovine albumin, thrombin "Roche", and thoroughly washed platelets were used.) It was found, however, that a system consisting of a dialyzate from citrated or oxalated bovine plasma or serum (0.3 ml), washed bovine platelets (0.2 ml), bovine fibrinogen (0.4 ml, 0.6% in NaCl) and coagulated by addition of 0.1 ml of a 0.1% solution of thrombin "Roche", was always capable of retracting normally to one-third of the original length of the clot. (In terms of fluid expressed this corresponds to well over 90% the original volume of the unretracted clot.) It can be shown that the dialyzable substance¹³ is a limiting factor with respect to completeness of retraction, that is, the lengths of the fully retracted clots depend upon its concentration. This strongly suggests that the dialyzable factor and the thrombocytes are linked together by some stoichiometric relationship.

The same system without fibrinogen should cause viscous metamorphosis of the platelets and this was indeed the case. It can be shown that retraction begins only after viscous metamorphosis has taken place. By using a more concentrated suspension of thoroughly washed intact platelets, a much more direct proof for our view can be offered: a few minutes after addition of dialyzate and thrombin at 37°C the platelets formed a fragile coagulum, which, carefully detached from the walls of the test tube, retracted rapidly to a small knob. This occurred in a system completely free of even traces of fibrinogen. The solution expressed from this retracted platelet-clot added to a small amount of fibrinogen clotted the latter due to the presence of thrombin. This clot showed no retraction whatsoever, although it must have been rich in serotonin. Retraction also did not occur when the dialyzate in our minimum system was replaced by the same volume of a solution of 100 mg% serotonin in NaCl. This result is in obvious contrast to the findings by FENICHEL and SEEGER¹⁴. We believe, therefore, that a viscous protein contained in the thrombocytes, formerly called by us protein "S", and not the fibrin is the retractile material in thrombocyte-containing fibrin clots.

The implications of a dialyzable and thermostable factor (30 min at 100°C) in plasma which together with thrombin¹⁵ causes the viscous metamorphosis of platelets are evident: it obviously is part of the system which is essential in the mechanism of haemostasis in addition to the fibrinogen-fibrin system. It may offer in part an explanation for cases described of bleeding tendencies in spite of a completely intact clotting system, which up to now have been ascribed to defective thrombocytes (i.e. thrombasthenia GLANZMANN). It may be noted that in these conditions retraction is indeed sometimes absent.

The existence of a self-contained system responsible for haemostasis by clumping of the platelets followed by

⁴ R. JÜRGENS and H. BRAUNSTEINER, *Schweiz. med. Wschr.* 80, 1388 (1950).

⁵ E. F. LÜSCHER, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 912 (1955).

⁶ E. F. LÜSCHER, *V. Europ. Hämatologenkongr. Freiburg i. Br.* 1955 (in press).

⁷ D. E. BERGSAGEL, *V. Europ. Hämatologenkongr. Freiburg i. Br.* 1955 (in press).

⁸ J. H. WRIGHT and G. R. MINOT, *J. exper. Med.* 26, 395 (1917).

⁹ O. E. BUDTZ-OLSEN, *Clot retraction* (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1951), p. 56.

¹⁰ CH. E. ELLICOTT and E. L. CONLEY, *Bull. John Hopkins Hosp.* 88, 321 (1951).

¹¹ A. FONIO and J. HENSELER, *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 15, 598 (1952).

¹² A. G. WARE, M. M. GUEST, and W. H. SEEGER, *Arch. Biochem. Biophys.* 13, 231 (1947).

¹³ H. HARTERT [*Klin. Wschr.* 32, 139 (1954)] mentions also a factor responsible for retraction which could not be obtained by methods of protein-fractionation.

¹⁴ R. L. FENICHEL and W. H. SEEGER, *Amer. J. Physiol.* 181, 19 (1955).

¹⁵ Until now only thrombin "Roche" has been used in our work. The possibility of a contamination of this product by other factors has to be considered, and work in this direction is in progress.

vasoconstriction due to subsequently liberated serotonin from the platelets is of interest also from a phylogenetic standpoint, since it is well known that more primitive animals, as for instance certain crabs¹⁶, have only this haemostatic mechanism. It seems, therefore, that the fibrinogen-fibrin system is a further step in the development of haemostasis, whereby the older system has kept its full importance.

Finally, it may be added that the new factor should also be considered in further studies on the mechanism and prevention of thrombus formation.

E. F. LÜSCHER

*Physiologisches Institut der Universität, "Hallerianum"
Bern, February 9, 1956.*

Zusammenfassung

Die visköse Metamorphose der Blutplättchen ist ein von der Fibrinbildung unabhängiger Prozess, der durch Thrombin und einen thermostabilen, dialysierbaren Faktor aus Plasma oder Serum ausgelöst wird. Das unter diesen Bedingungen aus den zerfallenden Plättchen austretende Material kontrahiert sich spontan. Dies erklärt die Gerinnselretraktion, bei der dem Fibrin folglich eine völlig passive Rolle zukommt.

¹⁶ L. LOEB in: J. ALEXANDER, ed. *Colloid Chemistry: Theoretical and applied*, Vol. 2 (Chemical Catalog Company, New York), p. 487.

Zum Vorkommen neuraminsäurehaltiger Glykoproteide

KLENK¹ konnte erstmalig 1941 Neuraminsäure in Form ihrer stabilen Methoxylverbindung aus Gangliosiden isolieren. Während die Neuraminsäure zunächst nur als charakteristischer Bestandteil von Lipoiden angesehen wurde, gelang KLENK und LAUENSTEIN² im Jahre 1952 die Isolierung der Methoxyneuraminsäure auch aus Glykoproteiden und zwar aus Submaxillarmucin und Harnmucin. Wie wir³ vor kurzem mitteilten, kommt Neuraminsäure auch im Blutserum des Menschen vor. Es gelang uns die Isolierung kristallisierter analysereiner Methoxyneuraminsäure aus menschlichem Serum⁴. Unsere Befunde wurden inzwischen durch die Arbeiten von C. CHATAGNON und P. CHATAGNON⁵ bestätigt. Die Neuraminsäure ist im Serum nach unseren Untersuchungen⁶ nicht an Lipide, sondern an Glykoproteide gebunden. Nach WINZLER⁷ dargestellte Glykoproteide enthielten nach unseren Untersuchungen 8% Neuraminsäure⁸. In pathologischen Seren fanden wir deutliche

Erhöhungen des Neuraminsäurespiegels⁶, der bei normalen Versuchspersonen zwischen 40 und 65 mg% liegt.

Mit Hilfe der früher³ mitgeteilten Neuraminsäurebestimmungsmethode konnten wir bei 15 von uns untersuchten Tierarten im Blutserum Neuraminsäure in etwa gleicher Grössenordnung wie beim Menschen nachweisen. Die Werte schwankten zwischen 30,3 und 105,1 mg%.

Bei der Untersuchung von Eiweissfraktionen mit einem Reinheitsgrad von über 95% (die Substanzen wurden uns liebenswürdigerweise von Herrn Professor Dr. H. E. SCHULTZE, Behringwerke, zur Verfügung gestellt) fanden wir den höchsten Neuraminsäuregehalt im α_1 -niedermolekularen Säureprotein, das 9,14% Neuraminsäure enthielt. Abgesehen vom Albumin wurde in jeder von uns untersuchten Eiweissfraktion des Serums Neuraminsäure gefunden. Über den Neuraminsäuregehalt des Fibrinogens bzw. Fibrins haben wir bereits berichtet⁹. Hämoglobin enthält Neuraminsäure höchstens in Spuren. Da das Hämoglobin durch seine rote Farbe die Neuraminsäurebestimmung unmöglich macht, wurde es nach BÖHM und BAUMEISTER¹⁰ gespalten und die Methoxyneuraminsäure isoliert. Hierbei wurden so geringe Mengen erhalten, dass sie nicht sicher dem Hämoglobin zugesprochen werden können. Sie entstammen möglicherweise Spuren von Serum, die unserem Ausgangsprodukt angehaftet haben könnten.

Im Urin gesunder Versuchspersonen konnten wir mit unserer Methode keine Neuraminsäure nachweisen. Im eiweisshaltigen Urin jedoch fanden wir, wie auch C. CHATAGNON und P. CHATAGNON¹¹, Neuraminsäure. Der Neuraminsäuregehalt betrug bis 5,9 mg%.

Im Liquor gesunder Versuchspersonen fanden wir zwischen 0,14 und 0,42 mg% Neuraminsäure. Bei Patienten lagen die Werte zum Teil wesentlich höher; den höchsten Wert von 12,2 mg% hatte ein Patient mit einer Meningokokkenmeningitis. Im Ascites, im Pleurapunktat und in Ödemflüssigkeit liess sich ebenfalls Neuraminsäure in wechselnden Mengen nachweisen; der Neuraminsäurespiegel lag jedoch immer tiefer als der des entsprechenden Serums. Im Speichel fanden wir einen Neuraminsäuregehalt von 4,4 bis 8,2 mg%. Aus methodischen Gründen liess sich nicht in jedem Speichel Neuraminsäure bestimmen, da die Farbe nicht immer charakteristisch war. GYÖRGY und Mitarbeiter¹² gelang es erstmals, aus Frauenmilch Neuraminsäure zu isolieren. In Frauenmilch fanden wir relativ hohe Neuraminsäurewerte (33,8–146 mg%), während wir in Kuhmilch (Molkereimilch) nur etwa 13 mg% fanden.

Über die klinischen Untersuchungsergebnisse berichten wir ausführlich an anderer Stelle.

P. BÖHM und L. BAUMEISTER

Medizinische Universitätsklinik Bonn, den 2. Januar 1956.

Summary

The results are reported of investigations on the content of neuraminic acid in serum of 15 animal species, pure serum protein fractions, fibrin, haemoglobin, urine, liquor, saliva and milk.

⁹ P. BÖHM und L. BAUMEISTER, *Klin. Wschr.* 33, 712 (1955).

¹⁰ P. BÖHM und L. BAUMEISTER, *Z. physiol. Chem.* 300, 153 (1955).

¹¹ C. CHATAGNON und P. CHATAGNON, *C. r. Soc. biol.* 148, 1765 (1954); *Ann. Biol. clin.* 1955, Nr. 1–2.

¹² J. R. E. HOOVER, G. A. BRAUN und P. GYÖRGY, *Arch. Biochem. Biophys.* 47, 216 (1953). – F. ZILLIKEN, G. A. BRAUN und P. GYÖRGY, *Arch. Biochem. Biophys.* 54, 564 (1955).

¹ E. KLENK, *Z. physiol. Chem.* 268, 50 (1941).

² E. KLENK und K. LAUENSTEIN, *Z. physiol. Chem.* 291, 147 (1952).

³ P. BÖHM, St. DAUBER und L. BAUMEISTER, *Klin. Wschr.* 32, 289 (1954).

⁴ P. BÖHM und L. BAUMEISTER, *Klin. Wschr.* 32, 611 (1954); *Z. physiol. Chem.* 300, 153 (1955).

⁵ C. CHATAGNON und P. CHATAGNON, *C. r. Soc. biol.* 148, 1226 (1954).

⁶ P. BÖHM und St. DAUBER, Vortrag auf der 60. Tagung der Gesellschaft für Innere Medizin, München, 25.–29. April 1954.

⁷ H. E. WEIMER, J. W. MEHL und R. J. WINZLER, *J. biol. Chem.* 185, 561 (1950).

⁸ P. BÖHM, Vortrag auf der 7. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologische Chemie, Kiel, 20.–22. September 1954.

Preliminary Investigations on the Influence of Reserpine Therapy on Adrenocortical Function in Schizophrenia¹

HOAGLAND, RINKEL and HYDE² studied the metabolic effects of the administration of lysergic acid diethylamide and ACTH to schizophrenic patients. They have discussed the biochemical aspects of schizophrenia in relation to adrenaline and serotonin metabolism, and the comparatively poor response of the adrenals of schizophrenic patients to stimulation by ACTH. KLINE³ has produced further evidence of the value of reserpine therapy in the symptomatic treatment of schizophrenia and other mental disorders. We have studied the urinary excretion of adrenal cortical steroids in 8 schizophrenic patients given graded doses of reserpine over a four-week period. The recently described rapid and simple method of APPLEBY, GIBSON, NORBYMERSKI and STUBBS⁴ for the assessment of adrenocortical function has been used in these experiments. The method measures selectively the total 17-hydroxylated C₂₁ adrenal steroids (17-OH, K.G.S.). Since difficulty is encountered in collecting complete 24 h specimens of urine from mentally disturbed and overactive patients, we have expressed our results as 3 day average ratios of urinary 17-OH, K.G.S. to urinary creatinine.

The results are summarized in the Table.

The influence of reserpine therapy on urinary 17-OH, K.G.S./creatinine ratio in schizophrenic patients

Patient	Ratio of 17-OH, K.G.S./creatinine			
	No reserpine	Dosage of reserpine		
		after 2 weeks therapy with reserpine (1-1.5 mg/day)	3rd week (6 mg/day)	4th week (9 mg/day)
D.N.	0.0106	0.0106	—	0.0103
F.L.*	0.0217	0.0110	—	0.0140
F.R.*	0.012	0.0085	—	0.0080
M.Y.*	0.017	0.006	—	0.0203
P.H.*	0.0193	0.0110	—	0.0101
R.N.	0.0133	0.0100	—	0.0112
V.S.*	0.0360	0.0100	—	0.0160
W.N.	0.0218	0.0150	—	0.0180

A statistical analysis of our results shows a significant reduction from the control values in the 3-day average ratios of urinary 17-OH, K.G.S./creatinine at the 1-1.5 mg dosage level for reserpine ($P = 0.02-0.01$). The results obtained at the fourth week compared with the controls are not highly significant ($P = 0.1-0.05$) indicating that further studies at the higher dosage levels are required. Since there was individual clinical variation in response to the chronic dosage with reserpine, it

is not surprising to note a lack of uniformity regarding 17 OH, K.G.S. excretion at this phase of the treatment. Our results show quite clearly that the lower dosage level of reserpine did not elicit stimulation of the pituitary adrenal axis. GAUNT, RENZI, ANTONCHAK, MILLER, and GILMAN⁵ showed that reserpine did not depress adrenal function in guinea pigs, but raised the question of the possibility of reserpine dampening the mechanism discharging ACTH in psychogenic stress.

GOODMAN, FLORSHEIM, and TEMPEREAU⁶ have shown that after 25 days administration of reserpine, 11 out of 17 patients showed no eosinopenic response in the Thorn test. These results, while possibly indicating a reduced functional state of the hypothalamic-pituitary adrenal axis, should be accepted with reserve in view of the criticism of the eosinophil response test by TYLER, MIGEON, and CASTLE⁷. Furthermore, WINSOR⁸ has demonstrated a lack of influence of reserpine treatment (0.5 mg dosage levels) on the adrenocortical response in normals.

In unpublished work, SPANNER, GINZEL, and BOS-COTT, have confirmed some of the results of HOAGLAND *et al.* relating to the increased adrenocortical activity in response to lysergic acid diethylamide, but as indicated by 17-OH, K.G.S. excretion. Furthermore, agents which we have studied which block the psychogenic effects of L.S.D. depressed also the adrenocortical activity simultaneously. The possibility that the sedation induced by reserpine in schizophrenic patients, is linked with a reduced output of adrenocortical steroids must therefore be considered.

R. J. BOSCOTT, M. JEAVONS, and
AMYA B. KAR

Departments of Anatomy and Experimental Psychiatry,
The Medical School, University of Birmingham, December
21, 1955.

Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Harnausscheidung von Nebennierenrinden-Steroiden bei 8 schizophrenen Patienten vor und während der Behandlung mit all-mählich ansteigenden Dosen von Reserpin. Eine sta-tistisch nachweisbare Verringerung der Nebennieren-rindenfunktion wurde während der Behandlung mit Reserpin beobachtet. Eine kritische Betrachtung dieser Ergebnisse wird vorgenommen.

⁵ R. GAUNT, A. A. RENZI, N. ANTONCHAK, G. J. MILLER, and M. GILMAN, Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 22 (1954).
⁶ J. R. GOODMAN, W. H. FLORSHEIM, and C. E. TEMPEREAU, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 90, 196 (1955).
⁷ F. H. TYLER, C. MIGEON, and H. CASTLE, Endocrinology 8, 256 (1955).
⁸ T. WINSOR, Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 61 (1954).

The Anticancerous Action of 6-Azauracil(3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazine)

In the course of the last few years several analogs of the nucleic acids purine bases were tested in the chemo-therapy of experimental neoplastic diseases. Some of these, e.g. 8-azaguanine and 6-mercaptapurine, have al-ready found their application in clinical practice.

¹ The authors wish to thank Professors J. ELKES and S. ZUCKERMAN for their keen interest and support in this study. A. B. KAR is on deputation from the Central Drug Research Institute, Lucknow, India, under the Colombo Plan. The technical assistance of Miss ANNE OVERTON and Miss SHEILA GREEN is acknowledged.
² H. HOAGLAND, M. RINKEL, and W. R. HYDE, Arch. Neurol. Psychiat. 73, 100 (1955).
³ N. S. KLINE, Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 107 (1954).
⁴ J. J. APPLEBY, G. GIBSON, J. K. NORBYMERSKI, and R. D. STUBBS, Biochem. J. 60, 453 (1955).

In this laboratory several analogs of the pyrimidine bases of the nucleic acids were studied and in the course of this research we have found that 6-azauracil, previously prepared by SEIBERT¹, exhibits a markedly pronounced antibacterial effect against *E. coli* in synthetic media. This effect may be abolished either by uracil or cytosine. The inhibitory action of 6-azauracil in the presence of uracil follows the law of strictly competitive inhibition^{2,3}. In synthetic medium 6-azauracil also exerts a strongly synergistic effect with streptomycin. However, no inhibitory action by 6-azauracil was noted in experiments with animals infected with *Salmonella typhi*⁴.

Table

	50% Mortality in days	P
Control	19.7	
6-azauracil	23.2	0.02
6-mercaptopurine	23.5	0.01

We have also tested the anticancerous effect of 6-azauracil by following the mortality curves of white mice (strain H) in groups of 10 animals inoculated intraperitoneally with 4,000,000 cells of the Ehrlich ascites carcinoma. 6-Mercaptopurine, which is known to have a marked anticancerous effect on this tumor⁵, was given for comparison. The treatment was started 24 h after the transplantation of the tumor and was continued for 10 days. Because of the practical non-toxicity of 6-azauracil, a relatively high dose was used. The individual daily dose, given intraperitoneally, was 250 mg of 6-azauracil per kg and 30 mg of 6-mercaptopurine per kg. The 50% mortality of the animals was calculated by the method of REED and MUENCH⁶. The reliability of the values obtained was judged by the *t*-test. The results are given in the Table.

Although 6-mercaptopurine had in our experiments a lower cancerostatic effect than described in the literature⁵, which may be due to the different strain of the Ehrlich ascites carcinoma used by us, the results show that the anticancerous effect of 6-azauracil is of the same order of magnitude as that of 6-mercaptopurine.

Since 6-azauracil is practically non-toxic and yet active against the Ehrlich ascites carcinoma *in vivo*, it seems probable that the neoplastic tissues differ in their metabolism of pyrimidine bases or nucleic acids, respectively. RUTMAN *et al.*⁷ reached an analogous conclusion from a study of the distribution of C¹⁴-marked uracil in various tissues of rats, where they found that only hepatoma contained appreciable amounts of the isotope. This uptake of uracil, exhibited solely by cancerous cells, would then explain the specific cancerostatic effect of its structural analog 6-azauracil.

The anticancerous activity is now being tested with other experimental tumors, and, because of its practical non-toxicity, clinical tests are envisaged.

F. ŠORM, A. JAKUBOVIČ, and
L. ŠLECHTA

Department of Biochemistry, Institute of Chemistry,
Czechoslovak Academy of Science, Prague, February 22,
1956.

Zusammenfassung

Es wurde die kanzerostatische Wirkung des 6-Azauracils auf den Ehrlich-Aszites-Tumor beschrieben und mit der Wirkung des 6-Mercaptopurins verglichen.

Conséquences de la thymectomie sur la formule leucocytaire chez le cobaye

Il a été communiqué précédemment que chez le cobaye l'administration prolongée d'extrait de thymus de BEZSSONOFF et COMSA entraînait des modifications amples de la formule cytologique du sang, de la rate et de la moelle¹. Ces modifications peuvent être résumées comme suit:

Les lymphocytes augmentent de nombre partout.

Les éosinophiles diminuent de nombre dans le sang et dans la rate. Elles augmentent dans la moelle. Ce sont surtout les formes mûres qui augmentent de nombre, de telle sorte qu'on a l'impression que l'hyperthymisation bloquait le débit des éosinophiles de la moelle vers le sang.

Ces remarques devaient être complétées par l'épreuve contraire, l'examen cytologique du sang chez le cobaye thymoprivé.

Expérience. Chez 15 cobayes mâles de 170 à 190 g d'un élevage consanguin le thymus a été extirpé suivant la méthode décrite ailleurs². Les animaux ont été examinés par la suite par groupes de 3 à 6, 12, 18, 24 et 30 jours après l'opération. Les examens cytologiques usuels ont été fait sur le sang prélevé par ponction du cœur. Le comptage différentiel est fait sur 200 cellules.

Les mêmes examens ont été faits sur 10 animaux normaux du même poids.

Les résultats sont résumés au Tableau.

On peut en dégager la conclusion suivante:

L'extirpation du thymus a pour conséquence une légère leucopénie, qui va en s'accroissant pendant 30 jours.

Cette leucopénie est essentiellement la suite de la baisse du taux des lymphocytes.

Le taux des éosinophiles augmente très mesurablement.

Ces deux modifications sont exactement de sens opposé à celles que l'on a pu observer chez le cobaye hyperthymisé.

J. COMSA

Clinique chirurgicale de l'Université de la Sarre, Homburg, le 23 mars 1956.

¹ J. COMSA, Acta endocrinol. 19, 406 (1955).

² J. COMSA, Rev. canad. Biol. 7, 416 (1948) (bibliographie).

¹ W. SEIBERT, Ber. dtsh. chem. Ges. 80, 494 (1947).

² F. ŠORM and J. ŠKODA, Coll. Czechosl. chem. Comm. 21, 487 (1956).

³ J. ŠKODA and F. ŠORM, Chem. listy 50, 1165 (1956).

⁴ F. ŠORM and J. ŠKODA (unpublished).

⁵ K. SUGIURA, Cancer Res. 13, 431 (1953).

⁶ L. J. REED and H. MUENCH, Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938).

⁷ R. J. RUTMAN, A. CANTAROW, and K. E. PASCHKIS, Cancer Res. 14, 119 (1954).

Image leucocytaire chez les cobayes thymiprives

Jours depuis l'opération	Leucocytes (1000/mm³)	% Lymphocytes	Mononucléaires	Plasmocytes	Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles
0	7,8 ± 0,7*	43 ± 8	5 ± 2	3,5 ± 1	46 ± 8	3 ± 0,8	0–2
6	7,8**	32	3	4	43	8	0
12	7,2	30	7	5	52	6	1
18	6,7	29	12	10	41	8	0
24	5,9	30	6	7	47	9	1
30	5,8	30	7	6	48	9	0

* Moyenne arithmétique et dispersion quadratique de 10 animaux

** Moyenne arithmétique de 3 animaux

Summary

In infantile guinea pigs, thymectomy determined a decrease of the leucocyte count in the circulating blood, resulting essentially from the decreased number of lymphocytes.

Eosinophiles increased noticeably in the same animals.

Thus the consequences of thymectomy were proved to be exactly opposite to those of administration of thymus extract as described in a previous publication.

Eine neue Gruppe
hochwirksamer Lokalanästhetika

Vor einiger Zeit haben wir Lokalanästhetika aus der Reihe der basischen Carbaminsäureester beschrieben¹. Im Rahmen der dabei gewonnenen Erkenntnisse haben wir eine Reihe von Alkoxyderivaten des Diphenylcarbaminsäurediäthylaminoäthylesters, welche bereits früher von FROMHERZ² beschrieben wurden, synthetisiert und neuerdings pharmakologisch geprüft.

¹ A. SEKERA, J. HRUBÝ, Č. VRBA und J. LEBDUŠKA, Českoslov. Farm. 1, 12 (1952). – A. SEKERA, I. JAKUBEC, J. KRÁL und Č. VRBA, Chem. Listy 46, 762 (1952). – A. SEKERA, A. BOROVANSKÝ, I. JAKUBEC, K. PALÁT und Č. VRBA, Českoslov. Farm. (im Druck).

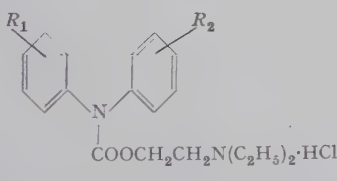
² K. FROMHERZ, Arch. exper. Path. Pharmacol. 76, 257 (1914).

Die Strukturen der bereiteten Präparate dieser Gruppe sind aus der Tabelle zu entnehmen. Als Ausgangsstoffe dienten Monoalkoxy- und Dialkoxydiphenylamine, welche durch Phosgen in die entsprechenden Carbaminsäurechloride umgewandelt wurden. Diese lieferten bei der Reaktion mit Natrium-diäthylaminoäthanolat Endprodukte, welche in Form ihrer Chlorhydrate pharmakologisch geprüft wurden.

Die Wirkung bei Oberflächenanästhesie (Kaninchenhornhaut, Standard Cocain) und Infiltrationsanästhesie (Meerschweinchen intradermal, Standard Novocain) wurde durch Ermitteln und Vergleichen gleichwirksamer molarer Konzentrationen der geprüften Substanzen mit konstanten Konzentrationen der Standarde (Cocain *m*/100, Novocain *m*/50) festgestellt. Bei einigen Präparaten wurde LD 50 an weissen Mäusen bei subkutaner Applikation bestimmt.

Aus den vorläufigen pharmakologischen Prüfungen (Tabelle) ist ersichtlich, dass die hergestellten Substanzen allgemein wirksamer als die angewandten Standarde sind. Als besonders aktiv erwiesen sich die *m*-Butoxyderivate S62 und S66, deren Wirksamkeit bei Oberflächenanästhesie im Vergleich zu Cocain 76mal bzw. 33mal und bei Infiltrationsanästhesie im Vergleich zu Novocain 40mal bzw. 37mal grösser ist. Die Verbindungen sind im Hinblick auf ihre Wirksamkeit wenig toxisch. Besonders günstig verhält sich S62, welches bei 8fach bzw. 14fach grösserer Wirksamkeit 5mal weniger toxisch ist als Cocain und sogar eine um rund 20% geringere Toxizität als Novocain aufweist.

Struktur und pharmakologische Wirkung der hergestellten Verbindungen

Präparat Nr.			Schmelzpunkt °C	Relative Wirksamkeit bei		LD50 subkutan mg/kg	
	<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂		Oberflächen- anästhesie	Infiltrations- anästhesie		
S 25	H	H	186	1,4	3,6	175	
S 60	4-C ₂ H ₅ ·O-	H	146-147	7,4	13	150	
S 61	4-C ₄ H ₉ ·O-	H	106-107	8	14,5	760	
S 62	3-C ₄ H ₉ ·O-	H	116-119	76	40	270	
S 63	2-C ₄ H ₉ ·O-	H	136	18	24,5	300	
S 64	4-C ₂ H ₅ ·O-	4-C ₂ H ₅ ·O-	134-136	2,8	6	-	
S 65	4-C ₄ H ₉ ·O-	4-C ₄ H ₉ ·O-	109-115	18	26	-	
S 66	3-C ₄ H ₉ ·O-	3-C ₄ H ₉ ·O-	97- 98	33	37	-	
Cocain				1	3,6	125	
Novocain				0,15	1	630	

Das chemische und pharmakologische Studium dieser Stoffgruppe wird fortgesetzt.

K. PALÁT, A. SEKERA und Č. VRBA

Institut für pharmazeutische Chemie der Masaryk-Universität und Pharmakologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei, den 21. März 1956.

Summary

Highly active and relatively little toxic local anesthetics from the group of diethylaminoethylesters of alkoxydiphenylcarbamic acids were developed. The substances were tested for local anesthetic activity in surface and infiltration anesthesia.

Contribution à l'étude d'une propriété répétitive du cerveau*

En poursuivant l'étude du fonctionnement cortical par la méthode électroencéphalographique et celle des images consécutives, nous en arrivons à penser que chaque stimulation provoque dans la région correspondante du cortex, non seulement une excitation simultanée, mais encore une *action consécutive*, c'est-à-dire que dans le temps qui suit la stimulation apparaissent spontanément (sans aucune stimulation nouvelle) dans la même région du cortex, plusieurs excitations successives dont l'intensité décroît progressivement¹.

Nous avons étudié les groupes consécutifs apparus sur les tracés corticographiques pris sur différentes régions corticales de l'animal (Lapin) à la suite de diverses stimulations (sonore, électrique, lumineuse). En comparant leur apparition à celle des images consécutives vues par le sujet après une stimulation lumineuse, au cours des expériences électroencéphalographiques sur l'homme nous avons été amené à identifier les deux phénomènes².

* Nous avons consacré à cette propriété répétitive du cerveau une note parue dans les Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Juillet 1955, Paris – dont le présent article constitue le développement.

¹ Mme C. POPOV, C. r. Acad. Sci. 241, 249 (1955).

² R. LANDOIE, *Lehrbuch der Physiologie des Menschen* (1916, Berlin, Wien), p. 804. – Mme C. POPOV, C. r. Acad. Sci. 241, 535 (1955).

Le conditionnement chez l'homme de ces images consécutives ainsi que celui chez l'animal des groupes consécutifs, démontre que ces phénomènes peuvent prendre naissance dans l'écorce cérébrale³.

Pour approfondir cette étude, nous avons entrepris deux séries d'expériences corticographiques avec enregistrement des tracés pris simultanément sur les régions pariétale et striée du Lapin.

La première série d'expériences était destinée à étudier les modifications apportées aux tracés par les stimulations lumineuses; la seconde, celles apportées aux mêmes tracés par une stimulation électrique faible.

Les électrodes étaient placées selon la méthode de N. A. POPOV⁴. Le support de l'électrode est enfoncé dans un trou pratiqué dans le crâne avec un trépan calibré, de façon à s'adapter exactement à ce trou, ce qui assure sa fixité. L'électrode est un ressort d'argent, dont l'extrémité en boucle horizontale repose sur la dure-mère intacte.

1re Série d'expériences (stimulation lumineuse). Nous avons employé la lumière d'une lampe de 100 W installée dans un appareil spécial, placé à 80 cm de l'œil de l'animal. La lumière était affaiblie par un filtre constitué par une grille métallique. La durée de l'éclairement était de 1,5 à 2 s, et les stimulations espacées de 2 min, environ chacune.

Voici nos observations: Chaque stimulation lumineuse provoque, au début de l'expérience, sur les tracés des deux régions, une légère baisse des oscillations spontanées que l'on peut considérer comme une inhibition par induction négative (PAVLOV). Mais à mesure que nous répétons les stimulations, apparaît une modification des réponses sur les tracés de l'*aire striée*, où l'on observe une légère augmentation des oscillations. Il s'agit donc de la transformation progressive d'une réaction négative en réaction positive, phénomène que nous avons également remarqué chez des animaux soumis à d'autres expériences. Dans l'*aire pariétale*, au contraire, l'inhibition par induction négative persiste à chaque stimulation lumineuse.

Sur la Figure 1, au moment de la stimulation lumineuse faible, on voit d'une part dans l'*aire striée*, les oscillations prendre un caractère plus régulier et de fréquence augmentée. Dans l'*aire pariétale*, d'autre part, on observe au même moment un aplatissement du tracé (Fig. 1a). Ces deux phénomènes, enregistrés simultanément dans les deux régions se répètent spontanément

³ Mme C. POPOV, C. r. Acad. Sci. 241, 249 (1955). – N. A. POPOV, C. r. Acad. Sci. 236, 744 (1953).

⁴ N. A. POPOV, *Année psychol.* 1948–1950, 223.

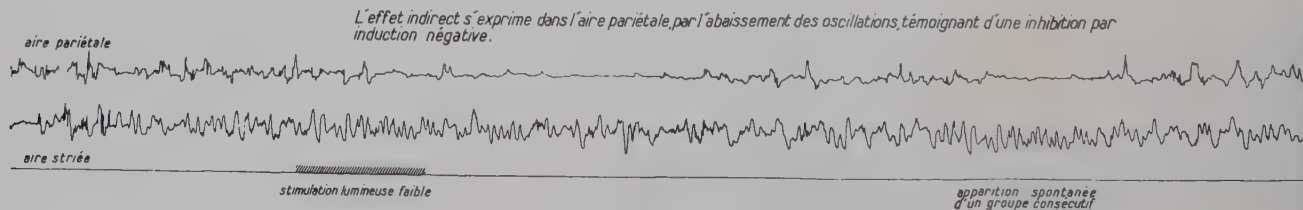


Fig. 1. Tracés électrocorticographiques pris sur l'aire striée et l'aire pariétale du Lapin. Stimulation lumineuse faible.

Action simultanée: Dans l'*aire striée*, réaction directe; on note un changement d'aspect des oscillations légèrement augmentées et régulières; dans l'*aire pariétale*, effet indirect qui s'exprime par l'abaissement des oscillations, témoignant d'une inhibition par induction négative.

Action consécutive: Quelques secondes plus tard, apparition spontanée sans aucune stimulation nouvelle, dans l'*aire striée*, d'un groupe consécutif semblable au groupe simultané; dans l'*aire pariétale*, de l'inhibition par induction négative correspondante.

quelques secondes après, constituant le premier groupe consécutif (Fig. 1*b*).

2^e *Série d'expériences* (stimulation électrique). L'action de la stimulation électrique faible s'exprime dès le début des expériences par l'apparition dans l'aire pariétale, au moment de la stimulation électrique, d'un groupe d'ondes caractéristiques, traduisant l'excitation corticale due à la stimulation électrique. Ce groupe se répète plusieurs fois de suite sans aucune stimulation nouvelle, ce qui constitue une *action consécutive* (Fig. 2*b*¹). Dans l'aire striée, simultanément à chacun de ces groupes, on observe un aplatissement du tracé, traduisant une inhibition par induction négative pavlovienne (Fig. 2*b*²).

Au cours du conditionnement son-stimulation électrique, le son conditionné donné seul, provoque également une action consécutive (Fig. 2*c*¹, *c*²). Dans l'exemple mentionné sur la Figure, elle comporte 22 groupes consécutifs conditionnés apparus spontanément. Au moment de l'apparition de chaque groupe consécutif conditionné, nous observons dans la région striée un abaissement des oscillations comme on était en droit de s'y attendre.

CATHERINE POPOV

Laboratoire du Conditionnement, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, le 12 janvier 1956.

Summary

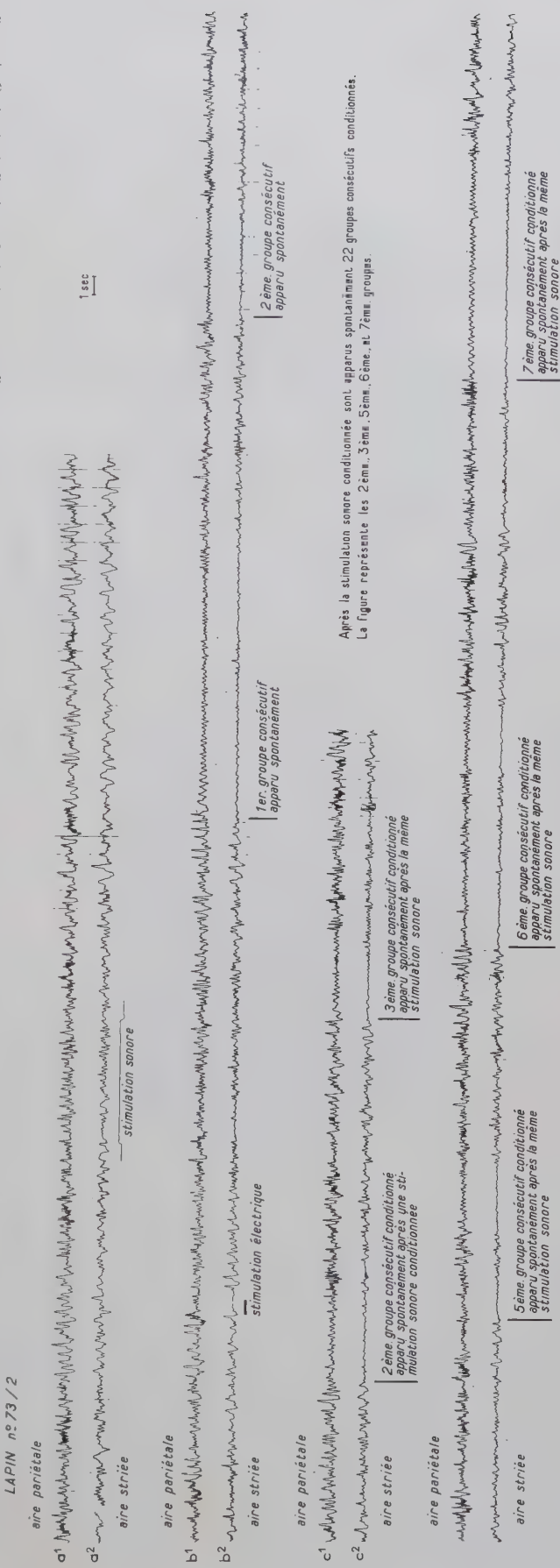
While pursuing the study of cortical functioning by the EEG. and after-image methods, we have come to believe that every stimulation evokes in the corresponding area of the cortex not only a simultaneous excitation but also a *continued action*, i.e. after stimulation, several successive excitations of progressively diminishing intensity appear in the same area of the cortex.

We have investigated the continued groups appearing on corticographical tracings taken from different cortical areas of the experimental animal (the rabbit) after various forms of stimulation (auditory, electrical, and visual). By comparing them with the after-images seen by human subjects in EEG. experiments, we have been led to identify the two phenomena.

In order to carry this study further, we have undertaken two series of corticographical experiments, recording tracings taken *simultaneously from the parietal and striate areas* of the rabbit. The first series was intended to study the effects on the tracings of visual stimuli. The second was concerned with the effects on the same tracings of weak electrical stimuli.

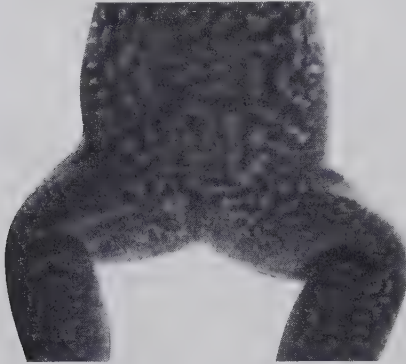
Fig. 2. Tracés électrocorticographiques pris sur l'aire striée et l'aire pariétale du Lapin. A. Activité spontanée de l'aire pariétale (*a*¹) et de l'aire striée (*a*²): Le son à la suite des répétitions n'a pratiquement plus d'effet (extinction). B. Effet d'une stimulation électrique: *b*¹ *Aire pariétale*, l'action directe d'une stimulation électrique faible provoque l'apparition simultanée d'ondes petites et régulières. Quelques secondes plus tard, apparaissent spontanément des groupes consécutifs, reproduisant les mêmes ondes petites et régulières. — *b*² *Aire striée*, action indirecte traduite par abaissement des oscillations pendant la durée des groupes simultanés et consécutifs. →

C. Effet du son conditionné donné seul: *c*¹ *Aire pariétale*, apparition spontanée des groupes d'ondes caractéristiques de la réponse de cette région aux stimulations électriques. — *c*² *Aire striée*, réaction parallèle d'inhibition par induction négative. →



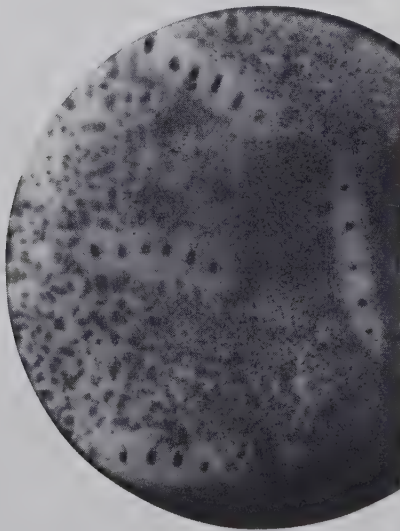
Elektrophysiologische Untersuchungen an der Seitenlinie von *Xenopus laevis*.

Nachdem sich das Seitenorgansystem des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) in orientierenden Versuchen¹ als ein besonders günstiges Objekt für die elektrophysio-



a

logische Methode erwiesen hatte, wurden die Innervationsverhältnisse genauer studiert und weitere Ableitungsversuche vom Seitennerven vorgenommen. Über



b

Abb. 1. *a* Einige Längsknospenreihen der oberen Seitenlinie und Querknospenreihen der mittleren am Abdomen von *Xenopus* (Dorsalansicht). *b* Eine Längs- und drei Querknospenreihen mit Andeutung der einzelnen Sinnesknospen (präpariertes Hautstück; Ansicht von aussen).

einen Teil der Befunde soll im folgenden kurz berichtet werden².

¹ Frühjahr 1951.

² Die Durchführung der Versuche fand (mit Unterbrechungen) während der Jahre 1951–1954 statt. Massgeblich daran beteiligt waren die Studenten der Biologie A. C. J. BURGERS (Innervation), P. F. ELBERS und A. M. STADHOUDERS (Elektrophysiologie). Für die Innervationsverhältnisse sei auf die rezente Arbeit von R. W. MURRAY (Quart. J. micr. Sci. 96, 351 [1955]) verwiesen, dessen Ergebnisse mit den unsrigen im wesentlichen übereinstimmen.

Anatomie der Seitenorgane bei Xenopus. Die freien Sinnesknospen liegen zu kurzen Längs- und Querreihen vereint entlang der bei Amphibien üblichen drei «Seitenlinien» in der Haut des Abdomens. In der vorliegenden Untersuchung kamen vor allem die Sinnesorgane der mittleren Seitenlinie (die sich aus Querreihen zusammensetzt) und zum Teil auch jene der oberen (Längsreihen) zur Ableitung (Abb. 1). Diese beiden dorsolateral gelegenen Seitenlinien verlaufen parallel und dicht nebeneinander von der Schulter- zur Analgegend. Obwohl die Längsknospenreihen der oberen als die Querknospenreihen der mittleren Seitenlinie werden von je einem eigenen Nerven aus versorgt. Beide Nerven verlaufen an der Innenoberfläche der Haut. Für jede Knospenreihe verlassen zwei Fasern den betreffenden Nerven; sie verzweigen sich und innervieren beide jede einzelne Sinnesknospe der Reihe. Ausser diesen «dicken» Fasern (etwa 21 μ) enthalten die Nerven noch eine Anzahl «dünner» Fasern (etwa 4 μ); auch von diesen treten jeweils einige an die Knospenreihe heran. Eine frei vorragende Cupula war an den Sinnesknospen nicht zu sehen, was ihr Vorhandensein aber nicht ausschliesst.

Methodik. Die Versuchstiere (Krallenfrösche verschiedener Herkunft) wurden durch Zerquetschen von Hirn und Rückenmark getötet und immobilisiert. Die Nerven der oberen und mittleren Seitenlinie wurden von der Schultergegend ausgehend teilweise freigelegt. Durch Versengen mit dem Thermokauter wurden dann unter optischer Kontrolle (Binokular) sukzessive sämtliche Knospenreihen bis auf eine – wirksame – ausser Funktion gesetzt. Als mechanische Prüfreize dienten dabei Pipettenströmchen oder auch Berührung der Haut in der Nähe der Sinnesknospen mit einem Pinselhaar. Das Tier wurde nun auf einer schiefen Unterlage befestigt, so dass sich der Hinterkörper unter Wasser befand und Strömungsreize auf die erhaltene Knospenreihe einwirken konnten. Vorderteil und Nerv blieben ausserhalb des Wassers. Beobachtung und Registrierung der Aktionsströme erfolgten in der üblichen Weise (Philips Oszillograph GM 5652).

Versuchsergebnisse. Bei Ableitung vom Seitennerven zeigt sich die von sämtlichen acustico-lateralen Sinnesorganen her bekannte «spontane Aktivität»³. Nach Ausschaltung aller Knospenreihen bis auf eine erhält man in der Regel nur mehr Impulse einer Grösse, das heisst von einer Nervenfaser (Abb. 2*a*). Manchmal sind es dagegen zweierlei Impulse, wohl von den beiden «dicken» Nervenfaser (Abb. 3*a*). Zusätzliche Kauterisierung der betreffenden Knospenreihe bringt die Impulse zum Verschwinden. Das spontane Feuern in der Einzelfaser erfolgt meist mehr oder weniger unregelmässig, vielleicht infolge irgendwelcher Präparationsschäden. Ein Regelmass wie im Beispiel der Abbildung 4*a* war jedenfalls eher Ausnahme.

Mechanische Reizung bewirkte Frequenzzunahme der spontanen Impulse und als Nacheffekt eine vorübergehende Abnahme der Impulsfrequenz (Abb. 2*b*). Von den beiden Fasern der in Abbildung 3*a* dargestellten Knospenreihe reagierte bei Reizung mit einem Pipettenströmchen bloss eine in dieser Weise (Abb. 3*b*), die andere eher entgegengesetzt (?). Bei Erzeugung einer hin- und herschwankenden Wasserbewegung im gesamten Versuchsgefäss ergab sich, dass Strömung von kaudal nach rostral für die Querknospenreihen der mittleren Seitenlinie frequenzsteigernd wirkt, Strömung von vorn nach hinten dagegen ausgesprochen impuls hemmend (Abb. 4*b*). Bei einer Längsknospenreihe der obe-

³ Vgl. S. DIJKGRAAF, Exper. 8, 205 (1952).

ren Seitenlinie bewirkte in ähnlicher Weise (wenn auch etwas weniger ausgeprägt) Wasserströmung von lateral nach medial Frequenzzunahme, Strömung in umge-

bisher nicht mit der gleichen Deutlichkeit beobachtet wurden, halten wir es für sehr wohl möglich, dass es solche Fasern gibt (vgl. hierzu auch Abb. 3b).

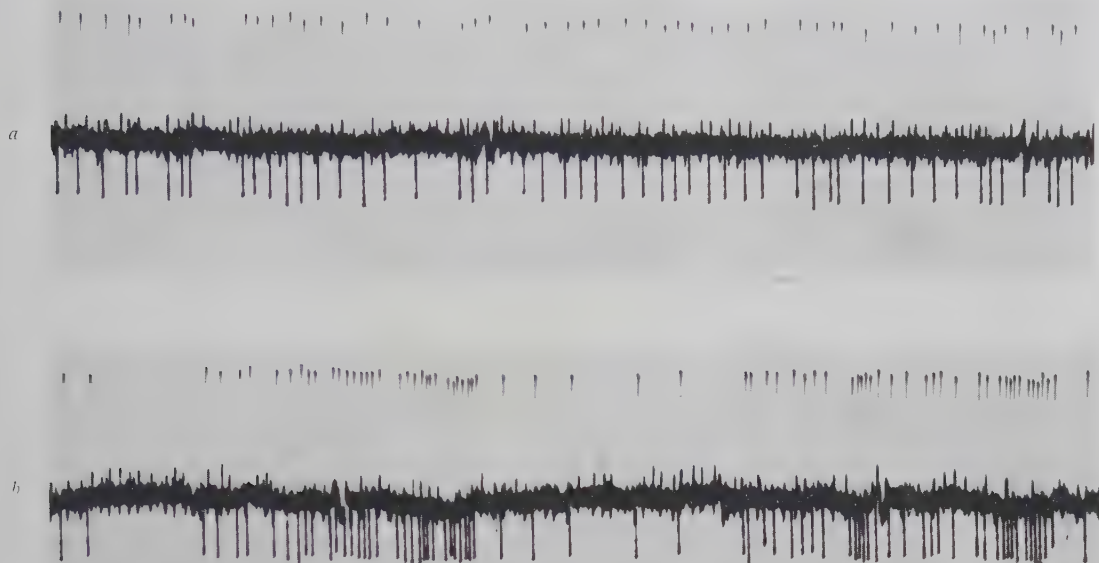


Abb. 2. *a* Spontane Aktivität einer Querknospenreihe: eine Impulsgrösse (alle Oszillogramme sind von rechts nach links zu lesen und mit derselben Geschwindigkeit und Verstärkung aufgenommen, sofern nicht anders angegeben). *b* Dasselbe Präparat bei zweimaliger Reizung durch Pinselberührung der Haut.

kehrter Richtung Hemmung der Impulse in der gleichen Faser. Obwohl entgegengesetzt ansprechende Fasern

Versuche, eine Querknospenreihe der mittleren Seitenlinie aus einer fixierten Pipette parallel zur Hautober-



Abb. 3. *a* Spontane Aktivität einer Querknospenreihe: zwei Impulsgrößen. *b* Dasselbe Präparat bei zweimaliger Reizung durch ein Pipettenströmchen.



Abb. 4. *a* Besonders regelmässige spontane Aktivität einer Querknospenreihe (von links nach rechts zu lesen). *b* Dasselbe Präparat bei Hin- und Herschwanken der gesamten Wassermasse (ebenfalls von links nach rechts zu lesen); kopfwärts gerichtete Wasserbewegung wirkt frequenzbeschleunigend, schwanzwärts gerichtete hemmt die spontanen Impulse.

fläche einmal in Längsrichtung der Knospenreihe, dann quer zu ihr anzuströmen, ergaben eine etwas grössere Wirksamkeit im letzteren Fall. Das galt aber nur, wenn die Strömung dabei von hinten nach vorn lief; Anströmen in Richtung von vorne nach hinten bewirkte im Gegenteil, wie gesagt, Hemmung der Impulse.

S. DIJKGRAAF

Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, Holland, den 23. März 1956.

Summary

Electrophysiological recording of the spontaneous activity from a single group of lateral sense organs on the abdomen of *Xenopus laevis* results in a more or less regular series of large spikes, either all of the same height or of two different sizes (each group is innervated by two "large" lateralis fibres). Mechanical stimulation of such a group may cause a rise or a fall of spontaneous impulse frequency. There is evidence for a two-directional sensitivity of the same unit (nerve fibre) from a single group, out of the middle as well as out of the dorsal lateral line.

The Relation Between Gamma Motor Activity and the Electroencephalogram

The gamma motor fibres of LEKSELL¹, innervating the intrafusal fibres of the muscle spindles, have a wide range of connections and are controlled not only by spinal reflexes but also to a great extent from supra spinal levels. Diffuse connections between the gamma motor system and most parts of the brain have been demonstrated, and the physiological significance of the muscle spindle activity has recently been elucidated by GRANIT and his collaborators². In all this work, attention has been drawn to the close relation between the

gamma motor system and the reticular activating system³ on the one hand, and the bulbo-reticular inhibitory system⁴ on the other. One might therefore expect to find correlations between the activity of cerebral cortex and of muscle spindles under conditions in which the influence of spinal reflexes on muscle spindles was minimized and kept constant. By recording electroencephalogram and the activity of single muscle spindles simultaneously under various conditions in cats and rabbits, this was verified, and sometimes extremely good correlation was obtained.

Electroencephalograms from motor, temporal and occipital areas of the cortex were recorded in lightly anaesthetized cats and rabbits, simultaneously with the activity of single muscle spindles led from fine filaments of dorsal roots. Needle electrodes for subcortical stimulation and heating electrodes for the thermosensitive structures of the anterior hypothalamus were inserted stereotactically. As a rule "arousing" stimuli such as nociceptive procedures, lowering the body temperature, twisting the pinna or electrical stimulation of the mesencephalic reticular formation were found to "activate" (desynchronize) the cortical activity and at the same time to cause increased muscle spindle activity. On the other hand, procedures which were found to inhibit muscle spindle activity, such as raising the body temperature, local heating of the hypothalamus, and elicitation of some skin reflexes from the upper thoracic and neck region, were usually accompanied by synchronization of cortical activity. "Spontaneous" fluctuations in cortical activity were several times found to be synchronous with those seen in the muscle spindle record, *c.f.* Figure. The anaesthetic level had, however, to be critically balanced. Doses of anaesthetics just large enough to give slow wave activity in the electroencephalogram, did not abolish gamma motor activity. In such cases, hypothalamic heating could influence muscle spindle discharge without any noticeable effects on the electroencephalogram. Unimpaired cortical activity was thus not necessary for hypothalamic effects on gamma motor activity. Neither were the changes in cortical activity secondary to fluctuations in muscle spindle discharge, since they were readily obtained in *encéphale isolé* preparations. Thermosensitive structures in the anterior part of the hypothalamus may thus influence

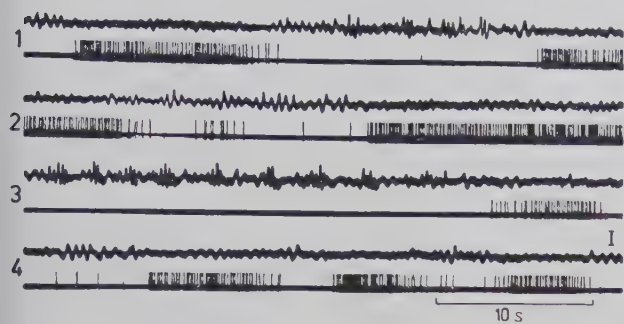
¹ L. LEKSELL, *Acta physiol. scand.* 10 [Suppl. 31], 84 (1955).

² R. GRANIT, *Receptors and Sensory Perception* (Yale Univ. Press, New Haven 1955).

³ G. MORUZZI and H. W. MAGOUN, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 1, 455 (1949).

⁴ H. W. MAGOUN, *Science* 100, 549 (1944).

cerebral cortex and gamma motor system by a common relay system within the reticular formation of the brain stem.



Rabbit. Chloralose-urethane. EEG from left motor area. Muscle spindle afferent from left gastrocnemius. Note high frequency irregular spindle discharge simultaneously with periods of desynchronized EEG. Muscle spindle silent when slow waves appear in EEG.

Occasionally a muscle spindle was inhibited synchronously with cortical "arousal" when stimulating the midbrain tegmentum, indicating that the activating relay system of the brain stem may be functionally subdivided, or may be less functionally uniform than is often believed. Another consideration that has to be borne in mind is that the single spindle afferent sampled in such an experiment may not be typical of the gamma system as a whole. Electroencephalogram gives statistical information of the activity in a great number of neurones. The muscle spindle test might, on the contrary, tell us about the situation in a restricted part of the motor system only. Considering this the good correlation generally obtained is still more impressive.

C. VON EULER and U. SÖDERBERG

The Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Sweden, April 9, 1956.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die Weckreaktion im EEG meist mit Erregung der Muskelspindeln verknüpft war. In tieferer Narkose konnten die Muskelspindeln bei Erwärmung des Hypothalamus noch beeinflusst werden, ohne dass im EEG nennenswerte Veränderungen auftraten. Thermische Reizung im Hypothalamus konnte aber auch bei der «encéphale isolé»-Katze langsame, grosse Wellen in Grosshirnrinden-Ableitungen hervorrufen. Wahrscheinlich werden die Muskelspindeln und die Aktivität der Grosshirnrinde dabei über dasselbe System vom Hirnstamm beeinflusst.

Excitability Changes and Muscle Atrophy After De-afferentation

The problem of muscle atrophy has absorbed the interest of a large number of experimental and clinical workers. In spite of many new facts in this field it is not possible, at the present time, to state precisely, which factors are most important in determining the onset and

rate of muscle atrophy. A disturbance of the trophic influence of the nervous system is generally assumed, but the term "trophic influence" lacks a physiological definition.

A number of papers published by GUTMANN and his collaborators show that the basis of nervous trophic influence is in the activation of metabolic recovery processes following muscle stimulation (GUTMANN, VODIČKA and VRBOVÁ¹; BASS, GUTMANN and VODIČKA² and others). These recovery processes differ in rate and extent in normal innervated and denervated muscles. They have been found to be influenced by the functional state of nerve centres. For example, coffee activates these recovery processes, while bromides depress them. Myelotomy (GUTMANN, VODIČKA and VRBOVÁ¹), as well as reflex nociceptive stimulation (GUTMANN and VODIČKA³) have a similar depressing effect on these metabolic recovery processes.

After section of the dorsal roots in the cat and the rat, a tendency to extension develops, which is in accordance with observations described in literature (HERING⁴, RANSON⁵ *et al.*). We have had ample opportunity of observing exaggerated reflex activity of the de-afferented hind limb, e.g. crossed extensor reflex etc. (see also TRENDLENBURG⁶, BREMER⁷, RANSON⁵ *et al.*). From our observations, we have been able to conclude that tendency to extension after de-afferentation does not develop immediately after the operation but by the 7th-10th day, and is not dependant on the presence of spinal ganglia. It seems probable, therefore, that these changes of excitability are of central (spinal) origin and that tendency to extension is not mediated by the spinal ganglia as RANSON⁵ postulated. Extirpation of spinal ganglia leads to a similar tendency to extension of section of the dorsal roots proximal to the ganglion.

It is possible to interpret these findings in terms of Cannon's Law of Denervation (CANNON and ROSENBLUETH⁸) and consider them to be the result of afferent denervation of spinal neurones. DRAKE and STAVRAKY⁹ have postulated this extension of the Law of Denervation to de-afferentation. We have offered the following explanation. Antigravity muscles are mostly connected to the myotatic 2-neurone reflex arc, so that degeneration of the central stump of the dorsal roots leads to the destruction of synaptic endings on extensor motoneurons, while flexor motoneurons are, most probably, to a great extent protected by their interneurone pool.

We have further evidence for the increased excitability of extensor motoneurons after de-afferentation. Changes of chronaxy in cats before and after de-afferentation were studied. Chronaximetric difference between flexor and extensor muscle groups is well marked under normal conditions in cats, similar to man (LAPICQUE¹⁰), and is present until about the 10th day after the operation. By this time we noted a gradual decrease in chronaximetric

¹ E. GUTMANN, Z. VODIČKA, and G. VRBOVÁ, *Physiol. Bohemoslov.* 3, 182 (1954).

² A. BASS, E. GUTMANN, and Z. VODIČKA, *Physiol. Bohemoslov.* 4, 267 (1955).

³ E. GUTMANN and Z. VODIČKA, *Physiol. Bohemoslov.* 2, 389 (1953).

⁴ H. E. HERING, *Neurol. Zbl.* 17, 1077 (1897).

⁵ S. W. RANSON, *Arch. Neurol. Psychiat.* 19, 201 (1928).

⁶ W. TRENDLENBURG, *Arch. Physiol.* 1906, 1.

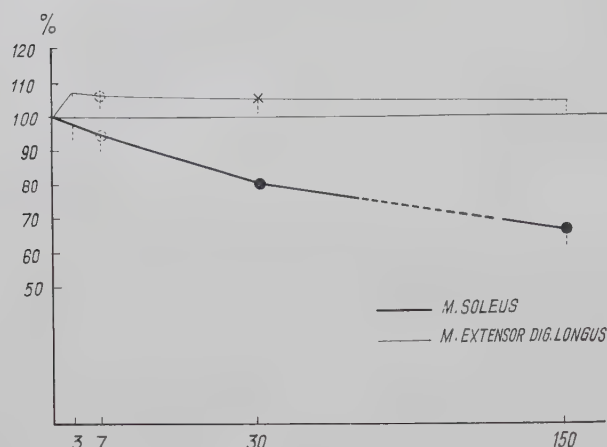
⁷ F. BREMER, *Ann. Physiol. Physicochim. Biol.* 4, 750 (1928).

⁸ W. B. CANNON and A. ROSENBLUETH, *The Supersensitivity of denervated Structures. A Law of Denervation* (New York, 1949).

⁹ C. G. DRAKE and G. W. STAVRAKY, *J. Neurophysiol.* 11, 229 (1948).

¹⁰ L. LAPICQUE, *L'excitabilité en fonction du temps* (Paris 1926).

values for extensor muscles, which led to a levelling out of the flexor-extensor difference. These results, together with observations described above, are considered as evidence for the increase of excitability of motoneurons in the anterior spinal horns for extensor muscles after de-afferentation.



Weight changes in m. soleus and m. extensor digitorum longus after section of the dorsal roots L_1-S_1 proximal to the spinal ganglia in the rat. The results are expressed in percentage of control muscle weight of the contralateral extremity (y axis). Muscles were weighed 3 days (7 animals), 7 days (26 animals), 30 days (32 animals) and 150 days (5 animals) after the operation (x axis). Values marked with a cross are statistically significant for $p = 0.05$, with a ring for $p = 0.01$ and with a dot for $p = 0.001$.

These changes in excitability lead to muscle atrophy in extensor muscles after de-afferentation. We studied weight changes in m. soleus (physiological extensor, anti-gravity group) and m. extensor digitorum longus (flexor group) after de-afferentation in cats and rats. It was found that m. soleus progressively atrophies after de-afferentation, while no weight changes were noted in m. extensor digitorum longus (see Fig.). Similar results, only less marked, were obtained on m. gastrocnemius and m. tibialis anterior.

The differences due to changes in excitability are further shown in experiments in which muscle hypertrophy or recovery of weight was evoked. On the one hand, we used unilateral amputation and daily "exercise" of the remaining de-afferented extremity by running rats (13 animals) in a rotating drum as a means of provoking muscle hypertrophy. On the other hand, reinnervation of de-afferented muscles 10, 20, and 30 days after crushing the nerve in 45 rats served as a model for weight recovery after denervation. In both cases the results were in agreement with our previous findings. In the amputation experiments, it was found that m. soleus atrophies, while m. extensor digitorum longus hypertrophies significantly more than in control animals. Weight recovery during reinnervation is significantly slower in m. soleus and a little faster in m. extensor digitorum longus than in control muscles.

These experiments also show that the atrophy of m. soleus after de-afferentation is not so much due to the loss of adaptational ability of de-afferented muscles to increased work exertion, as to the increase of excitability in extensor motoneurons in the anterior spinal horns following de-afferentation. De-afferentation atrophy of extensor muscles of the cat and rat may be considered to be a peripheral metabolic consequence of this increased

excitability of extensor motoneurons. We do not agree with KURÉ¹¹, WYBURN¹² and others, according to whom dorsal roots contain trophic nerve fibres, because a similar course of muscle atrophy was noted in extensor muscles after spinal gangliectomy in the rat as after section of the dorsal roots proximal to the spinal ganglia.

We may conclude that metabolic recovery (trophic) processes are influenced by the functional state of nerve centres, and that inactivity *per se* cannot fully explain the onset and rate of muscle atrophy.

P. HNÍK

Physiological Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, February 21, 1956.

Zusammenfassung

1. Die Deafferenzierung der hinteren Extremität bei Ratten und Katzen verursacht eine Neigung zur Extension, welche sich 7–10 Tage nach der Operation zu entwickeln beginnt; diese sehr ausgeprägte Neigung wird durch eine erhöhte Erregbarkeit der motorischen Vorderhornzellen erklärt, welche die Extensoren innervieren.

2. An der deafferenzierten Extremität atrophieren die Antigravitationsmuskeln (m. soleus und m. gastrocnemius), während man bei den Flexoren (m. extensor digitorum longus und m. tibialis anterior) kein Anzeichen von Atrophie findet.

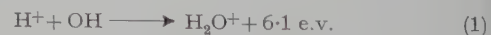
3. Die Deafferenzierungs-Atrophie der Antigravitationsmuskeln ist als eine in der Peripherie eintretende metabolische Folge des veränderten Funktionszustandes der Nervenzentren aufzufassen. Diese Ansicht konnte mit Hilfe weiterer Experimente (Reinnervation und Arbeitshypertrophie) bestätigt werden.

¹¹ K. KURÉ, Y. NITTA, H. MATSUURA, and M. TSUJI, *Z. ges. exper. Med.* 60, 250 (1928).

¹² R. WYBURN-MASON, *Trophic Nerves* (London, 1950).

On the Stability and the Reactions of the H_2O^+ Ion in Aqueous Solution

The existence of the H_2O^+ ion in the gaseous state has been fully established by mass-spectrometric observations. From a knowledge of the ionisation potential of the water molecule (12.6 e.v.)¹ and of other well known thermo-chemical data, it can be shown that H_2O^+ itself should have considerable stability since the association process:



is highly exothermic.

In aqueous systems, however, the situation might be different, since here one has to take into account the hydration energies; under these conditions, therefore, the equilibrium:



should be of considerable importance. With regard to the position of this equilibrium, it can be said that in view of the structural similarity of the H_2O^+ and H_3O^+

¹ Cf. W. C. PRICE, *Chem. Rev.* 41, 257 (1947).

ions respectively, it is to be expected that there will be resonance of the positive charge in both these ions. While this would favour H_3O^+ , it seems reasonable to suppose that this resonance will also confer some stability to the H_2O^+ ion. Furthermore, the dipole interaction energies of a proton with an H_2O molecule on the one hand and with an OH radical on the other, should be of the same order of magnitude.

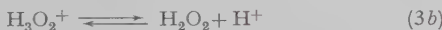
In view of these considerations, it is probable that whenever OH radicals are formed in aqueous solution, they may be present to a certain extent, in the form of (hydrated) H_2O^+ ions according to the equilibrium (2).

Hydroxyl radicals are known to play an important part in the reactions of hydrogen peroxide² and also in the action of ionising radiations on water³.

Recent studies have shown that a number of reactions of OH radicals in aqueous solution exhibit a pH-dependence, which can, in some cases, be accounted for by assuming processes involving the H_2O^+ ion.

For instance, in the hydroxylation of certain mono-substituted benzene derivatives by OH radicals, it was found that the ratio of the hydroxylated *ortho*-, *para*-, and *meta*-isomers shows a distinct pH-dependence⁴.

The presence of this ion may also have a bearing on the interaction of two OH radicals in aqueous systems. In the gaseous state the experimental evidence is strongly in support of the view that hydrogen peroxide is *not* formed by the recombination of two OH radicals ($2\text{OH} = \text{H}_2\text{O}_2$)⁵. However, this may be different in aqueous solutions, where it appears that, under suitable conditions, hydrogen peroxide can be formed directly by some interaction of OH radicals. It is suggested that, in acid solutions, hydrogen peroxide formation may take place according to:



In general, therefore, in all the reactions of OH radicals in aqueous systems, processes involving the participation of the H_2O^+ radical ion may have to be taken into account.

A detailed study of the pH-dependence of such reactions is now in progress and may give more information regarding the basicity of the OH radical in solution.

J. WEISS

University of Durham, King's College, Newcastle upon Tyne, April 9, 1956.

Zusammenfassung

Theoretische Überlegungen führen zur Annahme, dass das in der Gasphase wohlbekannte Molekölion H_2O^+ auch in wässriger Lösung unter geeigneten Bedingungen eine gewisse Stabilität besitzt. Es ist zu erwarten, dass dieses Ion, welches als protoniertes OH-Radikal aufgefasst werden kann, bei Reaktionen in saurer, wässriger Lösung eine gewisse Rolle spielt.

² Cf. J. WEISS, *Advanc. Catalys.* **4**, 343 (1952).

³ J. WEISS, *Nature* **153**, 748 (1944); *Brit. J. Radiol. Suppl.* **1**, 56 (1947).

⁴ H. LOEBL, G. STEIN, and J. WEISS, *J. chem. Soc.* **1950**, 2704; **1951**, 405. – G. R. A. JOHNSON, G. STEIN, and J. WEISS, *J. chem. Soc.* **1951**, 3275. – G. STEIN and J. WEISS, *J. chem. Soc.* **1951**, 3265.

⁵ K. F. BONHOEFFER and T. G. PEARSON, *Z. physikal. Chem. [B]* **14**, 1 (1931).

PRO EXPERIMENTIS

A New Fixative for Smoked Kymographic Tracings

By the difficulties encountered in using the traditional fixatives of alcoholic solutions of natural shellacs, we were induced to look for a new synthetic plastic substance for the fixation of smoked kymographic tracings.

The ideal properties for such a surface coating agent are: to be inexpensive, readily prepared, quick in drying and rendering the record permanently soft and flexible without any damaging effect to the smoked surface.

Such a fixative suitable for everyday use can be prepared from commercially available polybutyl methacrylate solutions. The available lacquer¹ contains 50% of the polymer in solution, it is transparent with a pale straw colouring.

As the viscosity of this solution is high, a 1 to 7 dilution of the concentrate is made with dry acetone.

The results obtained with this fixative correspond fully with requirements outlined above.

A. L. DELAUNOIS and T. O. KING

Department of Pharmacology, University of Ghent, Belgium, March 28, 1956.

Résumé

Une dilution de polybutyl méthacrylate dans de l'acétone anhydre (rapport 1 à 7) est proposée comme fixateur d'enregistrements sur papier enfumé. Ce nouveau fixateur est incolore, sèche vite, rend les enregistrements flexibles et est peu coûteux.

¹ Available as Vinalak No. 5909 from Vinyl Products Ltd., Cershalton, Surrey, England.

PRO EXPERIMENTIS

Efficacy of some Histochemical Techniques for Acid Mucopolysaccharides

In an earlier investigation¹ we studied, by chemical methods², the acid mucopolysaccharide content of the rats skin (hyaluronic and chondroitinsulphuric acids) and its variations under diverse experimental conditions. The histochemical examination by metachromasia with thionine was simultaneously made with a portion of the same material, fixed in a 4% formalin solution in 90° alcohol. In accordance with LISON's recommendations³ for avoiding false reactions, use was made of an aqueous 0.5% solution of that stain in an acid medium (pH 3.2) and of APATHY's syrup for mounting. Some sections were previously incubated for 5 h at 37°C with 1:25,000

¹ E. DEL CONTE, J. DELLA SALA, and M. STUX, *Acta endocrinol.* **20**, 343 (1955).

² R. H. PEARCE and E. M. WATSON, *Canad. J. Res. [E]* **27**, 43 (1949).

³ L. LISON, *Histochimie animale; méthodes et problèmes* (Gauthier-Villars, Paris 1936).

testicular hyaluronidase, while other sections, which served as controls, were incubated with saline solution and with filtered saliva. This procedure being followed, the identity of the results of the chemical and those of the histochemical methods was complete; a deeper metachromatic staining was found in the derms of skins which, by chemical means, proved to be richer in acid mucopolysaccharides and *vice versa*. On the other hand, the staining was not altered by ptyaline and it disappeared completely after treatment with hyaluronidase, which made it possible to ascribe it to the hyaluronic and chondroitinsulphuric acids, both being hydrolyzed by this enzyme⁴.

Further study of successive sections of the same material by other histochemical methods widely used for polysaccharides, such as those of McMANUS⁵ with periodic acid-SCHIFF and HALE's⁶, improved by RINEHART and ABUL-HAJ⁷, with colloidal iron, have enabled us to demonstrate, in the light of such chemical data as we possess, their relative efficiency for the demonstration of acid mucopolysaccharides. A mild staining was obtained with both methods in the derms of the various skins, while no significant change was appreciated corresponding to the varying concentration of the studied substances. No change in the degree of staining which could be attributed to the hyaluronic or chondroitinsulphuric acids was likewise noticed after treatment with ptyaline and hyaluronidase under the above-mentioned conditions; by contrast, the response to colloidal iron appeared to be more intense in some cases.

These results confirm that, despite its well-known affinity to various polysaccharides, McMANUS' method does not stain the acid mucopolysaccharides⁸ and that HALE's method, which was specifically suggested for these substances, is not more valuable for this purpose⁹. The metachromatic reaction, however, notwithstanding some objections¹⁰, is quite simple and, if duly carried out with adequate precautions and supported by incubation with hyaluronidase, retains an undeniable practical value in the demonstration of acid mucopolysaccharides¹¹.

E. DEL CONTE and M. STUX

Laboratorios Experimentales, Lavalle 332, Buenos Aires, March 12, 1956.

Résumé

L'efficacité relative de certaines méthodes histo-chimiques utilisées habituellement pour la mise en évidence des mucopolysaccharides acides a été étudiée sur des peaux de rats soumises à des conditions expérimentales diverses. Les différentes concentrations des subs-

tances en étude étaient connues, ayant été quantitativement déterminées par la méthode chimique de PEARCE et WATSON. La réaction métachromatique, réalisée avec les précautions nécessaires et avec le concours de la digestion par l'hyaluronidase, nous a fourni une image fidèle de la concentration de mucopolysaccharides acides. Ce n'est pas le cas lorsqu'on emploie l'acide périodique-SCHIFF ou le fer colloïdal qui ne semblent pas être très utiles pour la mise en évidence des substances étudiées.

PRO LABORATORIO

Ultramikrotom mit mechanischem Vorschub

Durch die grundlegenden Arbeiten der Schulen von PORTER und SJÖSTRAND ist gezeigt worden, dass hochauflösende Elektronenmikroskopie von Dünnschnitten nur möglich ist, wenn die Schnittdicke unter 300 Å liegt. Das beste erreichbare Auflösungsvermögen beträgt ungefähr $\frac{1}{10}$ der Dicke des Objektes¹. Auf verschiedener Grundlage wurden mehrere brauchbare Mikrotome entwickelt. Diese unterscheiden sich im wesentlichen nach der Art des Vorschubs und der Bewegung, die der Objekthebel beschreibt. Allen erfolgreichen Instrumenten ist gemeinsam, dass der Block nie hinter dem Messer zurückgeführt wird. Bei diesem Zurückführen wird der soeben abgehobene Schnitt auf den Block zurückgezogen; dadurch wird dieser benetzt; was ein weiteres Schneiden verunmöglicht. Thermischen Vorschub benutzen die Mikrotome von SJÖSTRAND², HODGE, HUXLEY und SPIRO³, v. BORRIES⁴ und GAUTIER⁵. In allen diesen Mikrotomen wird der Block in einer zum Messer parallelen Ebene rotiert. Im Mikrotom von FERNANDEZ-MORAN⁶ hingegen wird er in einer zum Messer senkrechten Ebene bewegt. Im einzigen Mikrotom mit mechanischem Vorschub (PORTER und BLUM⁷) wird ein langer Objekthebel mit Hilfe einer Führung seitlich am Messer vorbei zurückgeführt. Ein minimaler mechanischer Vorschub von 200 Å kann eingestellt werden.

In dem hier zu beschreibenden Mikrotom (vgl. Abb. 1) verwenden wir ebenfalls einen mechanischen Vorschub, jedoch eine rotierende Bewegung des Blocks in einer zum Messer senkrechten Ebene⁸. Das Mikrotom ist für Handantrieb vorgesehen.

Der Vorschubmechanismus wurde unverändert übernommen aus dem früher mit DANON⁹ entwickelten und von Trüb, Täuber & Cie fabrizierten Mikrotom: er ist zusammengesetzt aus der Bewegung einer Mikrometer-

⁴ M. B. MATHEWS, S. ROSEMAN, and A. DORFMAN, J. biol. Chem. 188, 327 (1951).

⁵ J. F. A. McMANUS, Nature 158, 202 (1946).

⁶ C. W. HALE, Nature 157, 802 (1946).

⁷ J. F. RINEHART and S. K. ABUL HAJ, Arch. Path. 52, 189 (1951).

⁸ D. V. DAVIES, Stain Techn. 27, 65 (1952). – A. G. E. PEARSE, Histochemistry; theoretical and applied (J. & A. Churchill Ltd., London 1953). – G. GOMORI, Microscopic histochemistry; principles and practice (The University of Chicago Press, Chicago 1952).

⁹ D. V. DAVIES, Stain Techn. 27, 65 (1952). – G. GOMORI, Microscopic histochemistry; principles and practice (The University of Chicago Press, Chicago 1952).

¹⁰ B. SYLVÉN and H. MALMGREN, Labor. Invest. 1, 413 (1952).

¹¹ A. G. E. PEARSE, Histochemistry; theoretical and applied (J. & A. Churchill Ltd., London 1953). – R. E. MANCINI (personal communication).

¹ V. E. COSSLETT in: Physical Techniques in Biological Research, Vol. 1 (Acad. Press Inc., 1955).

² F. S. SJÖSTRAND, Exper. 9, 114 (1953).

³ A. J. HODGE, H. E. HUXLEY und D. SPIRO, J. Histochem. Cytochem. 2, 54 (1954).

⁴ B. v. BORRIES, Exposition Intern. Conference on Electron Microscope, London 1954.

⁵ A. GAUTIER, Bull. Micr. appl. 5, 20 (1955).

⁶ H. FERNANDEZ-MORAN, Conference latinamer. neurocir. VI, Montevideo 1955.

⁷ K. R. PORTER und J. BLUM, Anat. Rec. 117, 685 (1953).

⁸ E. KELLENBERGER und A. RYTER, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 18, 1122 (1955).

⁹ D. DANON und E. KELLENBERGER, Arch. Sci. Genève 3, 169 (1950).

schraube, die eine geneigte Ebene vorschiebt; von dieser Ebene aus wird eine Hebeluntersetzung betätigt, gemäss dem klassischen Prinzip des Rocking-Mikrotoms. Die Mikrometerschraube wird durch ein Zahnrad bewegt. Ein Vorschub von 1–20 Zähnen kann durch einen einfachen Stellhebel am Handrad vorgewählt werden. Die Neigung der Glasebene ist regulierbar, so dass je Zahn ein Vorschub von 50 bis 500 Å eingestellt werden kann. Der Block wird in einen speziellen kleinen Halter eingeschraubt, der dann im Objekthebel festgeklemmt wird. Dieser Hebel wird in eine rotierende Bewegung

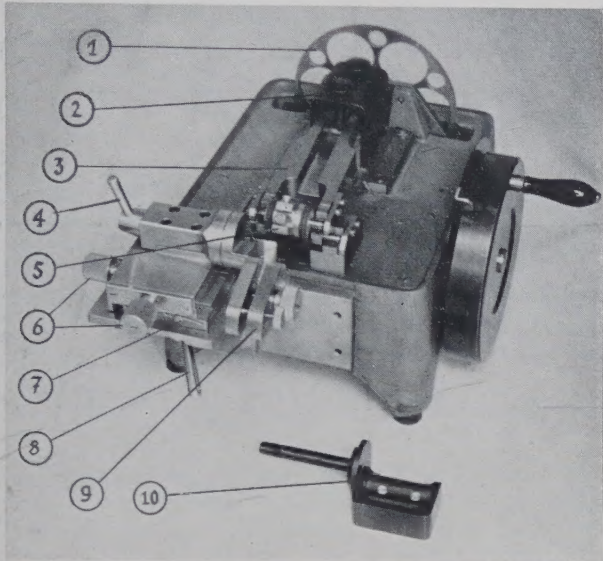


Abb. 1. Prototyp des Mikrotoms. 1 Zahnrad, das die Mikrometerschraube dreht; 2 geneigte Ebene mit regulierbarem Winkel; 3 Vorschubhebel; 4 Bajonettverschluss des Messerhalters; 5 rotierender Objekthebel mit der Blockpatrone; 6 Feintriebe zum Verschieben des Messers; 7 Blockierung der Feintriebe; 8 Blockierung der Grobeinstellung; 9 Glasmesserhalter; 10 Metallmesserhalter.

versetzt um eine Achse, die auf dem Vorschubhebel gelagert ist. Der eingestellte Vorschub wird dadurch dieser Achse mitgeteilt. Die Bewegung des Objekthebels wird erzeugt vom gemeinsamen Handrad, mit dem auch der Vorschub betätigt wird. Sie wird übertragen durch einen doppelten Flach- oder Keilriemenantrieb und durch eine Friktionskupplung. Besonders wichtig ist die Lagerung: Bei den allgemein üblichen sehr grossen Lagerflächen und infolgedessen sehr geringen Lagerdrücken ist die Stabilität sehr gering. Kleine von aussen wirkende Kräfte vermögen leicht die Lage der Achse zu verändern. Da die elastische Deformation der Lager nicht linear ist, sondern Funktion einer höheren Potenz, haben wir sehr grosse Lagerdrücke angewendet⁹. Im vorliegenden Prototyp haben wir die schon früher im Trüb-Täuber-Mikrotom eingeführte Lagerung einer Stahlachse auf zwei festen Stahlkugeln beibehalten. Andere, auf dem gleichen Prinzip beruhende Lösungen sind noch im Studium. Es zeigte sich, dass diese hohen Lagerdrücke eine sehr stabile Lage der Achse ermöglichen, die unempfindlich für äussere Einflüsse ist und bei der der Ölfilm konstante Dicke zu haben scheint. Der hohe Druck wird mit einer regulierbaren Spannvorrichtung durch die beiden Riemen erreicht. Je Kugel arbeiten wir mit einer Kraft von 1 bis 3 kg. Die Resultierende ist so gerichtet, dass eine wesentliche Komponente in Richtung des Vorschubs

besteht. Diese Komponente allein ist massgebend für die Stabilität in dieser Richtung und die dadurch bedingte Gleichmässigkeit der Schnittdicke.

Eine neue Messerhaltereinrichtung gestattet, auf einfache Weise die verschiedenen Messerhalter gegeneinander auszutauschen, so dass klassische Glasmesser¹⁰ oder Rasierklingen¹¹ angewendet werden können. Eine Grobeinstellung gestattet Bewegungen in einer horizontalen Ebene sowie Veränderung des Winkels zwischen Messerschneide und Block. Die Feineinstellung in zwei zueinander senkrechten Richtungen gestattet das Messer an den Block anzunähern und die guten Messerstellen aufzusuchen. Selbstverständlich ist auch der Schneidewinkel mit Hilfe einer Gradeinteilung einstellbar. Die Wanne, wie sie HILLIER und GETTNER¹² zum Auffangen der Schnitte eingeführt haben, ist im Falle des Stahlklingenhalters so ausgeführt, dass die Klinge von innen her befestigt wird. Dadurch fällt das Abdichten weg. In Messing ausgeführt, ist sie schwarz vernickelt oder chemisch geschwärzt, was die Beobachtung der freischwimmenden Schnitte wesentlich erleichtert. Schwarz eloxierte Aluminiumwannen bzw. parkerisierte Stahlwannen sind vorgesehen, um die elektrolytische Korrosion zwischen Messerstahl und Messing einzuschränken.

Die praktischen Versuche wurden zusammen mit A. RYTER ausgeführt. Verschiedene Gewebe in Plexiglas-einbettung¹³ wurden untersucht. Sowohl Glasmesser als auch geschärfte Rasierklingen wurden angewendet. Alle Schnitte wurden auf Wasser mit 10–12% Alkoholzusatz aufgefangen. Zur Verminderung der Elektrokorrosion wurde Ammoniak oder Morphin zugegeben. Folgende Eigenschaften wurden festgestellt:

Das Mikrotom ist thermisch unempfindlich. Dies rührt davon her, dass der Objekthebel sehr kurz ist. Auf mechanische Einflüsse, wie sie ein Gebrauch im Laboratorium ohne Spezialtische mit sich bringt, sprach das Mikrotom nicht an. Regelmässige Schnittserien mit 100 Å Vorschub konnten bei guten Messern und kleinen Pyramiden leicht erhalten werden. Bei jedem Durchgang wurde ein Schnitt erzeugt. Das erhaltene Band enthielt allerdings von Zeit zu Zeit auch dünnere oder dickere Schnitte als 100 Å. Ist das Messer schlecht, so weicht der Block elastisch aus, so dass nur noch bei jedem zweiten oder dritten Durchgang geschnitten wird. Schnittflächen bis zu 0,1 mm Seitenlänge konnten mit Glasmessern und einem Vorschub von 200 Å erreicht werden. Vibrationen, die zu Wellen im Schnitte führen, wurden bei Metacrylateinbettungen nicht beobachtet.

Vorrichtung zur Kontrolle der Schneide von geschärften Metallklingen

Nach der Technik von SJÖSTRAND geschliffene Rasierklingen¹¹ werden im Dunkelfeld-Auflichtmikroskop bei 900facher Vergrösserung auf die Qualität kontrolliert. Auf beiden Seiten werden die guten Stellen ausgemessen und nachher durch Rechnung festgestellt, wo eine beidseitig gute Schneide vorhanden ist. Um diese Rechnung abzukürzen, haben wir ein kleines Gerät konstruiert, das

¹⁰ H. LÄTTA und J. F. HARTMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 74, 436 (1950).

¹¹ F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikrosk. 62, 65 (1954).

¹² J. HILLIER und M. E. GETTNER, Science 112, 520 (1950).

¹³ S. B. NEWMANN, E. BORYSKO und M. SVERDLOW, J. Res. nat. Bur. Stand. 43, 183 (1949).

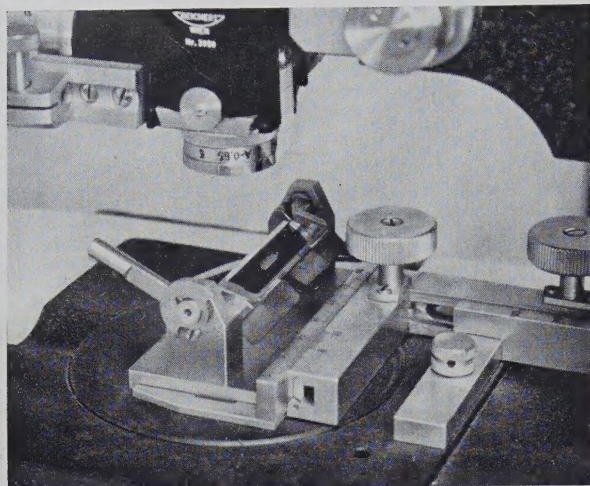


Abb. 2. Kippvorrichtung zur Beobachtung der geschärften Rasierklingen, eingesetzt in den Koordinatentisch des Reichert-Metatest-Mikroskopes.

in den Koordinatentisch des Mikroskopes eingesetzt wird. In diesem Gerät kann die Klinge um 128° gekippt werden. Da sich die Schneide in der Drehachse des Systems befindet, können auf diese Weise beide Schnittflächen beobachtet werden, ohne dass sich die Stelle im Mikroskop wesentlich verschiebt. Man erhält so sofort die Maße für beidseitig gute Schnitten. Die Klinge wird im Gerät magnetisch festgehalten. Der kippbare Halter besteht aus Stahl, der in der Mitte durch ein hartgelötetes Messingstück getrennt ist. Zwei kleine magnetische

Blöcke aus Spielzeugen wurden unten am Stahl derart befestigt, dass das Messer magnetischen Schluss ausführt. Dieses Gerät ist in Abbildung 2 ersichtlich.

Wir danken Mechaniker H. JUNG für seine äusserst wertvolle Mitarbeit in der Realisierung des Mikrotom-Prototyps, sowie Mme A. RYTER für die eingehende praktische Erprobung.

Die Entwicklung dieser Apparate wurde ermöglicht durch eine Subvention zur Förderung wissenschaftlicher Forschung aus eidgenössischen Arbeitsbeschäftigungskrediten. Wir danken der Firma Trüb, Täuber & Cie dafür, dass sie uns ein Mikrotom DM 2 zum Umbau zur Verfügung gestellt hat.

E. KELLENBERGER

Laboratorium für Biophysik, Physikalisches Institut der Universität Genf, den 27. März 1956.

Summary

(1) A new manually operated ultra-microtome is described. The specimen rotates in a plane perpendicular to the knife and its advance is regulated by a mechanical device. The advance may be set at a unit value of 60 to 500 Å, and is easily changed to multiples of this value during operation. The microtome is insensitive to mechanical and thermal influences.

(2) A device is described for determining the useful parts of a polished razor blade, in which both sides of the knife edge may be microscopically examined without its lateral displacement.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

CONGRESSUS

GREAT BRITAIN

IXth International Congress for Cell Biology

The next Cytological Congress will be held at the University of St. Andrews, Scotland, from 28th August to 3rd September, 1957. Admission will normally be restricted to members of the Society for Cell Biology and their guests. Others wishing to attend should communicate with the Secretary of the Congress, Professor H. G. CALLAN, Department of Natural History, The University, St. Andrews, Scotland.

The Congress will consist in part of a number of symposia, and in part of sessions at which papers on diverse topics may be read.

Corrigendum

W. KLYNE: *Conformational Studies on cycloHexananes*, *Experientia*, vol. XII, fasc. 3, p. 122 (1956).

The two paragraphs on page 122 (2nd column) beginning "Support for this is forthcoming..." are based on an error in calculation and should be disregarded. This error does not affect the correctness of the configuration (XXV, $R = H$, $R' = Me$) allotted to hedragonates on other grounds. The author is indebted to Dr. T. G. HALSALL (Oxford), for drawing his attention to this error.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acyланid

Cedilanid

Digilanid

Scillaren

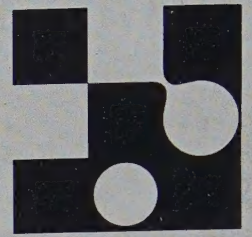
Strophosid



S A N D O Z A . G .



PLASTICA B



Clichés
Schwitter AG
Basel - Zürich

Dieses Inserat wurde mit

PLASTICA B

dem modernst hergestellten Duplikatcliché
gedruckt

PLASTICA B

ist hart, widerstandsfähig und hitzebeständig
(wichtig bei Stereotypen)

PLASTICA B

wird mittels der neusten Prägepresse und Plan-
schabmaschine (Rückenbearbeitung) hergestellt

PLASTICA B

eignet sich wegen seines minimalen Gewichts vor
allem auch für auswärtige Sendungen (Übersee)

PLASTICA B

von Schwitter AG